

# **Die Rolle endosomaler Toll-like Rezeptoren im Tumormikromilieu**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
**Johanna Klein**  
aus Braunschweig

im April 2016

---

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Forschungsabteilung der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Sven Brandau

2. Gutachter: Frau PD Dr. Annette Paschen

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Herr PD Dr. Bernd Giebel

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2016

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	8
1.1	Die Tumor-Stroma-Interaktion.....	8
1.1.1	Die Zellen des nicht-hämatopoetischen Stromas .....	8
1.1.2	Das Immunzellinfiltrat .....	10
1.1.3	Die Phasen der Tumor-Immunzell-Interaktion .....	13
1.2	Toll-like Rezeptoren.....	14
1.2.1	Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren.....	15
1.2.2	Anti-tumorale Effekte der TLR-Stimulation .....	17
1.2.3	Pro-tumorale Effekte der TLR-Stimulation.....	18
1.3	Zielsetzung .....	19
2	Material .....	21
2.1	Zelllinien .....	21
2.2	Mausstämme .....	22
2.3	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.4	Geräte .....	23
2.5	Chemikalien .....	25
2.6	Puffer und Lösungen .....	27
2.7	Zellkulturmedien .....	28
2.8	Stimulanzien .....	28
2.9	Kits.....	29
2.10	Antikörper .....	29
2.11	Primer .....	31
2.12	Software .....	32
3	Methoden.....	33
3.1	Tierexperimente .....	33

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.1	Mausstämme .....	33
3.1.2	Tumormodelle .....	33
3.1.3	Generierung von Chimären .....	34
3.1.4	Depletion von T-Zellen .....	34
3.2	Zellbiologische Methoden .....	35
3.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	35
3.2.2	Sphäroidassay mit murinen Hautfibroblasten .....	35
3.2.3	Isolation und Behandlung von murinen Immunzellen .....	36
3.2.4	Generierung und Stimulation von murinen DCs .....	38
3.2.5	Durchflusszytometrie .....	39
3.2.6	ELISA .....	40
3.3	Histologie .....	41
3.3.1	Pathomorphologische Tumoranalyse .....	41
3.3.2	Immunhistochemie .....	41
3.3.3	Immunfluoreszenzfärbung .....	42
3.3.4	Apoptosefärbung mit der TUNEL Färbung .....	43
3.3.5	Quantifizierung der histologischen Färbungen .....	43
3.4	Tumor-Clearing .....	43
3.4.1	Tumor-Clearing und Ultramikroskop .....	43
3.4.2	Adoptiver Zelltransfer .....	44
3.5	Molekularbiologie .....	45
3.5.1	Isolation von RNA und Reverse Transkription .....	45
3.5.2	Quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktion .....	45
3.5.3	cDNA Mikroarray Analyse .....	45
3.6	Statistik .....	46
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Der Einfluss von endosomalen Toll-like Rezeptoren auf das Tumorwachstum .....	47
4.1.1	Tumorabstoßung durch fehlende Toll-like Rezeptoren .....	47
4.1.2	Erhöhter Zelltod in Tumoren aus TLR-defizienten Mäusen .....	50
4.1.3	Welcher TLR-Signalweg ist für die Tumorabstoßung verantwortlich? .....	52
4.1.4	Die Rolle von kommensalen Bakterien auf das Tumorwachstum .....	56

# Inhaltsverzeichnis

---

4.1.5	Analyse der Genexpression in der frühen Phase der Tumorabstoßung .....	57
4.2	Die Rolle der Kompartimente der Tumormikroumgebung.....	64
4.2.1	Welches Zellkompartiment des Tumorstromas induziert die Abstoßungsreaktion? .....	64
4.2.2	Veränderungen im nicht-hämatopoetischen Stroma in Tumoren der TLR-defizienten Mäusen .....	65
4.2.3	Verstärkte Immunzellrekrutierung zu Tumoren aus TLR-defizienten Mäusen .....	70
4.2.4	Keine systemische Aktivierung von Immunzellen.....	71
4.2.5	Deutlich verstärkte Immunzellinfiltration in Tumoren aus TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	76
4.2.6	T-Zellen sind verantwortlich für die Tumorabstoßung.....	79
5	Diskussion .....	82
5.1	Endosomale TLRs haben einen pro-tumoralen Effekt .....	84
5.1.1	Zusammenwirken von zwei Signalwegen: MyD88 und Trif .....	84
5.1.2	Entgegengesetzte Effekte von TLR3/7/9 und TLR2/4 .....	86
5.2	Die Interaktion verschiedener Kompartimente der Tumormikroumgebung.....	87
5.2.1	Wie beeinflusst die TLR-Expression der malignen Zellen das Tumorwachstum?.....	88
5.2.2	Wie können die TLR-defizienten Immunzellen zu der Tumorabstoßung beitragen?.....	89
5.2.3	Wie können nicht-hämatopoetische Stromazellen das Tumorwachstum beeinflussen?.....	90
5.2.4	Wie beeinflussen die unterschiedlichen Gefäße das Tumorwachstum?.....	92
5.3	Welche TLR-Liganden können zur Tumorprogression beitragen? .....	94
5.4	Die Interpretation von Versuchen mit Knockout-Mäusen.....	97
5.4.1	Einschränkungen bei der Generierung von Knockout-Mäusen.....	97
5.4.2	Die Generierung der TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäuse .....	98
5.4.3	Wie kann das Tumorwachstum in den 3D-Mäusen erklärt werden?.....	98
6	Zusammenfassung .....	100
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Abkürzungsverzeichnis .....	115
9	Abbildungsverzeichnis.....	118
10	Tabellenverzeichnis .....	120

## Inhaltsverzeichnis

---

11	Anhang.....	121
----	-------------	-----

---

Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.  
(nach Aristoteles)

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Tumor-Stroma-Interaktion

Solide Tumore, insbesondere Karzinome als maligne Erkrankungen epithelialer Zellen, bilden keine Ansammlung entarteter Zellen allein, sondern sind eingebettet in ein sogenanntes Stroma. Das Wort Stroma kommt aus dem Griechischen und bedeutet Lager oder Decke. In den meisten Tumoren machen die Stromazellen den größten Anteil der Tumormasse aus (Becker *et al.*, 2013). Zwischen dem Tumor und seiner Umgebung findet eine hochkomplexe bidirektionale Wechselwirkung statt, welche essentiell für Versorgung, Wachstum und Metastasierung des Tumors ist (Goubran *et al.*, 2014). Die Tumormikroumgebung lässt sich in zwei Kompartimente unterteilen, in das nicht-hämatopoetische Stroma und das hämatopoetische Stroma, welches auch als Immunzellinfiltrat bezeichnet wird.

### 1.1.1 Die Zellen des nicht-hämatopoetischen Stromas

Das nicht-hämatopoetische Tumorstroma setzt sich aus Fibroblasten/Myofibroblasten, Gefäßen, glatter Muskulatur und extrazellulärer Matrix (ECM, *extracellular matrix*) zusammen (Li *et al.*, 2007). Zudem sezernieren Tumor- und Stromazellen Metaboliten sowie Enzyme, Chemokine und Zytokine (Becker *et al.*, 2013).

Die Infiltration mit Gefäßen ist essentiell, um den Tumor mit Nährstoffen zu versorgen. Die Bildung von neuen Gefäßen wird durch Substanzen, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), induziert, welche von Tumor- oder Stromazellen sezerniert werden. Dadurch kommt es zur Knospung neuer Gefäße aus umliegenden Gefäßsystemen oder zur Rekrutierung vaskulärer Vorläuferzellen. Zudem kann die „vaskuläre Mimikry“ induziert werden, bei der Tumorzellen gefäßartige Strukturen ausbilden (Li *et al.*, 2007). Gefäße bestehen normalerweise aus Endothelzellen die das Lumen ausbilden und perivaskuläre Zellen, die diese umgeben (Bergers and Song, 2005). Gefäße in Tumoren zeigen häufig strukturelle und funktionale Veränderungen, was unter anderem an einer gesteigerten Proliferation der Endothelzellen liegt. Die Gefäße weisen eine unregelmäßige Struktur auf und häufig bildet sich keine typische Hierarchie von größeren Gefäßen zu kleinen Kapillaren aus. Diese Veränderungen können unter anderem zu einer erhöhten Metastasierung führen (Stockmann *et al.*, 2014).

Ein weiteres Kompartiment stellen die Fibroblasten dar, die in vielen Tumoren, wie zum Beispiel Brust-, Prostata- und Pankreaskrebs, den größten Teil der Stromazellen ausmachen



(Kalluri and Zeisberg, 2006). Sie werden als CAFs (*cancer-associated fibroblasts*) bezeichnet und fördern im Gegensatz zu Fibroblasten aus gesundem Gewebe das Wachstum von Tumorzellen durch die Produktion von parakrinen Wachstumsfaktoren, proteolytischen Enzymen und ECM-Komponenten (Schreiber and Rowley, 2010). Durch die Sekretion von Faktoren wie CCL7, MCP-1/CCL2 und SDF-1 haben CAFs einen direkten Einfluss auf Tumorzellen. In einer Studie mit der Kopf-Halstumorzelllinie OSCC verstärkte die Sekretion von CCL7 beziehungsweise MCP-1/CCL2 durch CAFs *in vitro* die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (Jung *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). In humanen Brusttumoren konnte zudem ein direkter pro-tumoralen Effekt von SDF-1 auf die malignen Zellen beobachtet werden (Orimo *et al.*, 2005).

Auch indirekt können CAFs durch SDF-1 und VEGF das Tumorstadium beeinflussen, indem sie durch die Rekrutierung von tumorfördernden Makrophagen und endothelialen Vorläuferzellen die Gefäßbildung begünstigen (Orimo *et al.*, 2005). Des Weiteren produzieren sie TGF- $\beta$  (*transformin growth factor  $\beta$* ) und andere Zytokine, wodurch sie modulatorische Effekte auf das angeborene und das adaptive Immunsystem haben (Harper and Sainson, 2014). Wurden in tumortragenden Mäusen die CAFs durch eine anti-fibrotische Substanz inhibiert, infiltrierten deutlich weniger regulatorische Immunzellen das Stroma, da weniger SDF-1, Prostaglandin E<sub>2</sub> und TGF- $\beta$  sezerniert wurde (Ohshio *et al.*, 2015). Die gleiche Studie zeigte, dass die Kombination von einer DC-basierten Therapie mit einer anti-CAF Therapie synergistische suppressive Effekte auf das Tumorstadium hatte. Zudem führte die Kombinationstherapie systemisch zu einer erhöhten Anzahl zytotoxischer T-Zellen, einer erhöhten Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und einer verstärkten Reaktion der humoralen Immunität. Konform dazu führte die Entfernung einer Subpopulation von Fibroblasten zu einer besseren Kontrolle des Tumorstadiums durch das Immunsystem (Kraman *et al.*, 2010). Comito und Kollegen konnten zeigen, dass CAFs aus Prostata Tumoren humane Monozyten *in vitro* rekrutieren. In Makrophagen induzieren sie durch die Sekretion von Interleukin (IL)-6 und SDF-1 eine M2-Polarisierung, welche in Patienten mit Prostatakarzinomen in Verbindung mit einem schlechteren Überleben steht (Comito *et al.*, 2014). Auch MCP-1/CCL2, welches von Fibroblasten sezerniert werden kann, führt zur Polarisation in den M2-Phänotyp (Roca *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011).

Die infiltrierenden Makrophagen können wiederum die Entwicklung von Fibroblasten zu CAFs und die Bildung von Gefäßen begünstigen (Comito *et al.*, 2014). Neben Makrophagen wandern viele weitere Immunzellen in den Tumor ein und beeinflussen ihrerseits das Tumormilieu und somit die Tumorstadiumprogression.

### 1.1.2 Das Immunzellinfiltrat

Das Immunsystem soll uns grundsätzlich vor allem Gefährlichen schützen und wird unter anderem von Pathogenen, Allergenen, Stress oder durch Verletzungen aktiviert. Es kann unterscheiden zwischen „Fremd“ und „Selbst“, aber auch lernen, nützliche Darmbakterien zu akzeptieren. Bei der Tumor-Immunzellinteraktion zeigt sich jedoch eine dichotome Rolle des Immunsystems. Normalerweise erkennt das Immunsystem Tumorzellen als fremd und greift sie an. Durch eine zusätzliche Stimulation der Immunzellen durch Immuntherapeutika lässt sich dieser Mechanismus steigern und findet breite Anwendung bei verschiedenen Krebserkrankungen (Goldberg and Sondel, 2015). Entsteht durch das Tumorwachstum jedoch eine Situation, die mit einer chronischen Entzündung vergleichbar ist, werden regulatorische Immunzellen rekrutiert, die normalerweise eine zu starke Immunantwort abschwächen sollen, weshalb sie eine immunsuppressive Wirkung haben und somit das Tumorwachstum fördern (Grivennikov *et al.*, 2010). Daher wurden Tumore bereits 1986 als „Wunden, die nie heilen“ bezeichnet (Dvorak, 1986).

Das Tumorummunzellinfiltrat besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen der angeborenen Immunität wie Makrophagen, Neutrophilen, Mastzellen, dendritische Zellen (DCs) und Zellen der adaptiven Immunität wie NK-Zellen und verschiedenen T-Zellen. Für einige Zelltypen ist beschrieben, dass sie in der Tumormikroumgebung ihren ursprünglich anti-tumoralen Phänotyp ablegen und tumorfördernde Funktionen aufnehmen. Dementsprechend werden Makrophagen vereinfacht in einen anti-tumoralen M1-Phänotyp und einen pro-tumoralen M2-Phänotyp unterteilt. Während die M1-Makrophagen T-Zell-rekrutierende, tumorhemmende Chemokine wie CXCL9 und CXCL10 sezernieren, produzieren M2-Makrophagen tumorfördernde Chemokine. In den meisten humanen Tumoren korreliert daher eine erhöhte Anzahl von Makrophagen im Tumor mit einem schlechteren Überleben der Patienten (Biswas and Mantovani, 2010). In einem murinen Brusttumormodell konnten DeNardo und Kollegen zeigen, dass die Blockade der Makrophageninfiltration in den Tumor zu einem reduzierten Wachstum des Primärtumors und einer geringeren Metastasierung in die Lunge führte (DeNardo *et al.*, 2011).

Auch Neutrophile, die den Organismus normalerweise vor eindringenden Mikroorganismen schützen, infiltrieren Tumore in großer Zahl. Im Tiermodell wurden Hinweise gefunden, dass auch Neutrophile in einen anti-tumoralen N1-Typ zu einem pro-tumoralen N2-Typ unterteilt werden können (Fridlender and Albelda, 2012). Für viele Tumorentitäten wurde mittlerweile eine erhöhte Anzahl von tumor-infiltrierenden Neutrophilen mit einem schlechteren Krankheitsverlauf in Zusammenhang gebracht (Dumitru *et al.*, 2013). In unserer Gruppe konnte dies für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren gezeigt werden.

Neutrophile aus dem Blut dieser Patienten zeigten im Vergleich zu Neutrophilen gesunder Spender eine verringerte induzierbare ROS (*reactive oxygen species*)-Produktion und verringerte spontane Apoptose (Trellakis *et al.*, 2011a; Trellakis *et al.*, 2011b). Zu den pro-tumoralen Effekten neutrophiler Granulozyten zählen zudem die Förderung von Angiogenese durch die Sekretion von VEGF und MMP9, sowie die Stimulation der Tumorzellinvasivität und Metastasierung (Brandau *et al.*, 2013b; Fridlender and Albelda, 2012). Parallel konnten in verschiedenen Tumorentitäten und unter immunmodulatorischer Therapie anti-tumorale Funktionen von Neutrophilen dargelegt werden (Brandau *et al.*, 2013a).

DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und stellen somit die wichtigste Verbindung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität dar. Werden sie aktiviert, exprimieren sie verstärkt CCR7, CD80, CD86 und MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-II Moleküle auf ihrer Oberfläche und sezernieren IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-12. Sie wandern in die Lymphknoten, um dort die Zellen der adaptiven Immunität zu aktivieren (Johnson and Ohashi, 2013).

Zu den wichtigsten Effektorzellen gehören NK- und T-Zellen. NK-Zellen können im Tumormilieu durch den Einfluss von Interferonen und IL-2 aktiviert werden und haben die Eigenschaft die verringerte Expression von MHC-Klasse I (MHC-I) Moleküle auf Zellen zu erkennen („missing self“), was häufig bei virusinfizierten oder bei malignen Zellen auftritt. Werden NK-Zellen nicht mehr über die MHC-I-spezifischen Rezeptoren gehemmt, können sie die Zielzelle durch die Ausschüttung von Perforin und Granzyme B direkt eliminieren (Goubran *et al.*, 2014; Vivier *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu werden T-Zellen nur aktiviert, wenn ihnen von APCs Peptide auf deren MHC-Molekülen präsentiert werden. T-Zellen lassen sich in zwei Unterpopulationen aufteilen: CD4<sup>+</sup> T-Zellen und zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTLs). Letztere können durch die Sekretion von Zytokinen wie Interferon (IFN)- $\gamma$  und Effektormolekülen wie Perforin und Granzyme B ein anti-tumorales Milieu schaffen und ihre Zielzellen zerstören (Lakshmi *et al.*, 2013).

Aufgrund der hohen Effektivität zytotoxischer T-Zellen wird ihre Aktivierung streng reguliert. Dies geschieht durch sogenannte „Immun-Checkpoints“. Dabei binden Oberflächenrezeptoren, die sich vor allem auf T-Zellen befinden, an ihre Liganden, wodurch die Zellen entweder aktiviert oder inhibiert werden. In der Tumormikroumgebung werden verstärkt inhibitorische Liganden und Rezeptoren gefunden, welche die Antitumor-Aktivität der T-Effektorzellen reduzieren. Der in diesem Zusammenhang am besten untersuchte Rezeptor ist PD1 (*programmed cell death protein 1*), der von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Dessen Liganden sind PDL1/B7-H1 und PDL2/B7-DC, welche sich auf der

Zelloberfläche von APCs und Tumorzellen befinden können (Pardoll, 2012). Die Expression von den PD1-Liganden wurde in verschiedenen humanen Tumoren, wie Melanomen, Lungen-, Ovarial- und Ösopharguskarziomen nachgewiesen (Dong *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2004; Ohigashi *et al.*, 2005) und es konnte ein direkter inhibitorischer Effekt auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden (Gajewski, 2007). Daher werden zur Zeit Wirkstoffe in klinischen Studien getestet, welche PD-1 auf den T-Zellen blocken. Ipilimumab, ein Antikörper der den inhibitorische Rezeptor CTLA4 blockiert, wurde bereits von der FDA für die Behandlung von Melanomen zugelassen (Pardoll, 2012). Die Ko-Expression von PD1 und Tim-3 (*T cell immunoglobulin mucin 3*), ein weiterer negativer Regulator der T-Zell-Antwort, gilt als Zeichen für einen fortgeschrittenen Erschöpfungszustand von CTLs und nimmt durch die chronische Stimulation mit den Tumor-Antigenen im Laufe der Tumorentwicklung zu (Pardoll, 2012; Zhou *et al.*, 2011). Über 50% der CTLs, die aus murinen Darmtumoren isoliert wurden, exprimierten PD1 und Tim-3. Diese Zellen zeigten mehrere Anzeichen für Erschöpfung und Anergie, da sie sowohl ihr Proliferationsvermögen als auch die Möglichkeit zur Produktion von Zytokinen, wie IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , verloren hatten (Sakuishi *et al.*, 2010). Auch die Untersuchung des Aszites eines Melanompatienten zeigte, dass die infiltrierenden T-Zellen funktionale Defekte aufwiesen. Die Zellen enthielten kein Perforin und produzierten weniger IFN- $\gamma$  nachdem sie mit autologen Tumorzellen stimuliert wurden. Zudem kam es zu einer starken Infiltration mit regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>regs</sub>) (Harlin *et al.*, 2006).

Die meisten CD4<sup>+</sup> T-Zellen gehören zu der Gruppe der T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen), die sich in drei Populationen unterteilen lässt: T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen. T<sub>H</sub>1-Zellen induzieren durch die Sekretion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und zytolytischer Granula eine direkte Antitumor-Antwort. Zusätzlich können sie auch indirekt wirken, indem sie die Aktivierung und Expansion von CTLs fördern. Im Gegensatz dazu sezernieren T<sub>H</sub>2-Zellen große Mengen an IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, wodurch zytotoxische T-Zellen inhibiert werden (Lakshmi *et al.*, 2013). T<sub>H</sub>17-Zellen werden sowohl pro-, als auch anti-tumorale Effekte zugeschrieben. Die gegensätzlichen Befunde in humanen Tumoren und Mausstudien liegen vermutlich in der starken Plastizität dieser Zellen begründet. Sie können sich zu T<sub>H</sub>1-artigen Zellen entwickeln, aber auch die Eigenschaften von T<sub>regs</sub> annehmen (Lakshmi *et al.*, 2013).

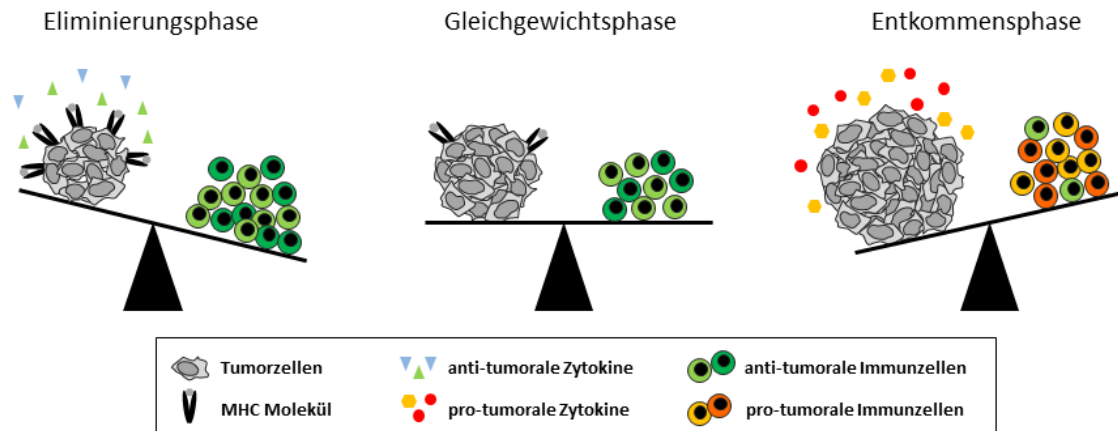
T<sub>regs</sub> stellen eine weitere Unterpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar. Sie blockieren autoreaktive T-Zellen und können die Entstehung einer Hyperinflammation verhindern. Sie infiltrieren aber auch Tumore, in denen sie tumor-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen inhibieren und somit eine pro-tumorale Wirkung haben. Dies geschieht durch direkten Zell-Zell-Kontakt und durch die Produktion von Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  (Curiel, 2007).

Eine erhöhte Infiltration mit  $T_{\text{regs}}$  steht daher in Verbindung mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen (Lakshmi *et al.*, 2013). In unserer Gruppe konnte in Tumoren von Kopf-Hals-Tumorpatienten ebenfalls eine verstärkte Infiltration mit  $T_{\text{regs}}$  gezeigt werden (Wild *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Die Phasen der Tumor-Immunzell-Interaktion

Im vorherigen Kapitel wurde bereits erläutert, dass Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität Tumorzellen erkennen und eliminieren können (*immunosurveillance*), aber auch zu der Progression des Tumors beitragen können. Die Fähigkeit des Immunsystems, die Immunogenität von Tumoren zu verändern wird als „Immunoediting“ bezeichnet (Schreiber *et al.*, 2011).

Diese Interaktion von Tumorzellen mit dem Immunsystem lässt sich in drei Phasen einteilen (Abb. 1.1). In der Eliminierungsphase (*elimination phase*) werden die veränderten Zellen von dem Immunsystem anhand von Tumor-spezifischen Antigenen erkannt und angegriffen. Durch sterbende Tumorzellen oder durch zerstörtes umliegendes Gewebe werden Gefahrensignale ausgeschüttet, die sogenannten DAMPs (*damage-associated molecular pattern*), die Zellen der angeborenen Immunität über Mustererkennungsrezeptoren aktivieren (siehe Kapitel 1.2). Dies führt zur Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen, wodurch weitere Immunzellen rekrutiert werden und die malignen Zellen vollständig eliminiert werden (Schreiber *et al.*, 2011). Treten in malignen Zellen jedoch Veränderungen auf, durch die sie schlechter von Immunzellen erkannt werden, gehen sie in die Gleichgewichtsphase (*equilibrium phase*) über. Nun befinden sich die malignen Zellen und das Immunsystem in einer dynamischen Balance. Die Tumorzellen befinden sich in einer Art Ruhephase, deren Proliferation von dem Immunsystem kontrolliert wird. Dieser Zustand kann für viele Jahre andauern, sodass es zu keiner klinisch ersichtlichen Erkrankung kommt (Vesely *et al.*, 2011). Verschiedene Prozesse können dazu führen, dass maligne Zellen sich der Kontrolle durch das Immunsystem entziehen. Dieser Schritt wird als Entkommensphase (*immunescape*) bezeichnet, da sich der Tumor nun ungehindert ausbreiten kann. Die Tumorzellen können sich durch eine veränderte Expression von Oberflächenmolekülen vor anti-tumoralen Immunzellen „tarnen“ und/oder ein immunsuppressives Mikromilieu generieren (Vesely *et al.*, 2011). Zusätzlich können Mutationen zu Defekten in regulatorischen Proteinen führen, wodurch die Tumorzellen verstärkt proliferieren und Zelltodmechanismen entgehen (Hanahan and Weinberg, 2011).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der drei Phasen der Tumor-Immunzell-Interaktion.** In der Eliminierungsphase werden die veränderten Zellen von dem Immunsystem erkannt und zerstört. In der Gleichgewichtsphase entsteht eine Balance zwischen Tumorproliferation und Zerstörung durch das Immunsystem. In der Entkommensphase haben sich die Tumorzellen so stark verändert, dass die Immunzellen sie nicht mehr bekämpfen können, zudem werden pro-tumorale Zellen rekrutiert.

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

Die essentielle Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Kontrolle von Tumoren wurde in dem vorherigen Kapitel ausführlich beschrieben. Diese Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Mustererkennungsrezeptoren, mit denen sie DAMPs, wie HMGB1 (*high mobility group box 1*) und Nukleinsäuren erkennen können, die von körpereigenen sterbenden Zellen abgegeben werden. Zudem schützen diese Zellen den Körper vor Infektionen mit Bakterien, Pilzen und Viren, da sie ein breites Spektrum von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP, *pathogen-associated microbial pattern*) erkennen. Dadurch werden frühzeitig Prozesse aktiviert, die zu einer Eliminierung der Erreger führen: Ausschüttung von toxischen Substanzen, Phagozytose und Lyse der Pathogene und infizierten Zellen, sowie die Sekretion von entzündungsfördernden Faktoren, die zur verstärkten Rekrutierung weiterer Immunzellen und zur Aktivierung des Komplementsystems führen (Iwasaki and Medzhitov, 2015). Toll-like Rezeptoren (TLRs) stellen die bekannteste Gruppe innerhalb der Mustererkennungsrezeptoren dar. Andere Mitglieder dieser Familie sind die C-Typ-Lektine, der NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-Rezeptor und die RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*)-ähnlichen Rezeptoren (Kawai and Akira, 2010).

Die Forschung an den TLRs wurde bereits mit zwei Nobelpreisen ausgezeichnet. Zum einen wurde im Jahr 1995 Frau Christiane Nüsslein-Volhard für die Entdeckung des *toll*-Gens

Mitte der 1980er Jahre in *Drosophila melanogaster* ausgezeichnet. Sie fand heraus, dass *toll* in dieser Spezies für die korrekte Entwicklung des Embryos notwendig ist (Anderson *et al.*, 1985). Später konnte Jules Hoffmann zeigen, dass im gleichen Organismus die Aktivierung des Toll-Proteins zudem für die Abwehr von Pathogenen benötigt wird, was ein Jahr später von Bruce Beutler für den homologen Toll-like Rezeptor in Mäusen, TLR4, gezeigt wurde (Lemaitre *et al.*, 1996; Medzhitov *et al.*, 1997). Beide erhielten im Jahr 2011 den Nobelpreis für ihre Arbeit.

In den folgenden Jahren wurde angenommen, dass sich in Säugetieren die Toll-like Rezeptoren ausschließlich auf Immunzellen befinden. Viele unabhängige Studien konnten zeigen, dass durch die Aktivierung der TLRs auf Immunzellen, diese pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine ausschütten (Barr *et al.*, 2007; Boonstra *et al.*, 2006; Hemmi and Akira, 2005). Mittlerweile ist bekannt, dass TLRs auch durch nicht-immunologische Zelltypen, wie Endothelzellen und sogar von Tumorzellen exprimiert werden. Auch diese Zellen reagieren auf TLR-Liganden mit der Sezernierung von pro-inflammatorischen und pro-tumoralen Zytokinen (Fitzner *et al.*, 2008; Gonzalez-Reyes *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2009; Tengroth *et al.*, 2014).

Bisher sind zehn funktionelle humane TLRs und zwölf murine TLRs bekannt. Während TLR1-9 in beiden Spezies vorkommen, wird TLR10 in Mäusen nicht exprimiert und TLR11-TLR13 im menschlichen Genom verloren gegangen (Kawai and Akira, 2010). TLRs befinden sich entweder auf der Zelloberfläche, wo sie vor allem konservierte Strukturen auf Bakterien oder Pilzen und endogene DAMPs erkennen (TLR1, TLR2, TLR4-6, TLR10), oder in den Endosomen, wo sie durch exogene und endogene Nukleinsäuren aktiviert werden (TLR3, TLR7-TLR9, TLR11-TLR13) (Kawasaki and Kawai, 2014).

### 1.2.1 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren

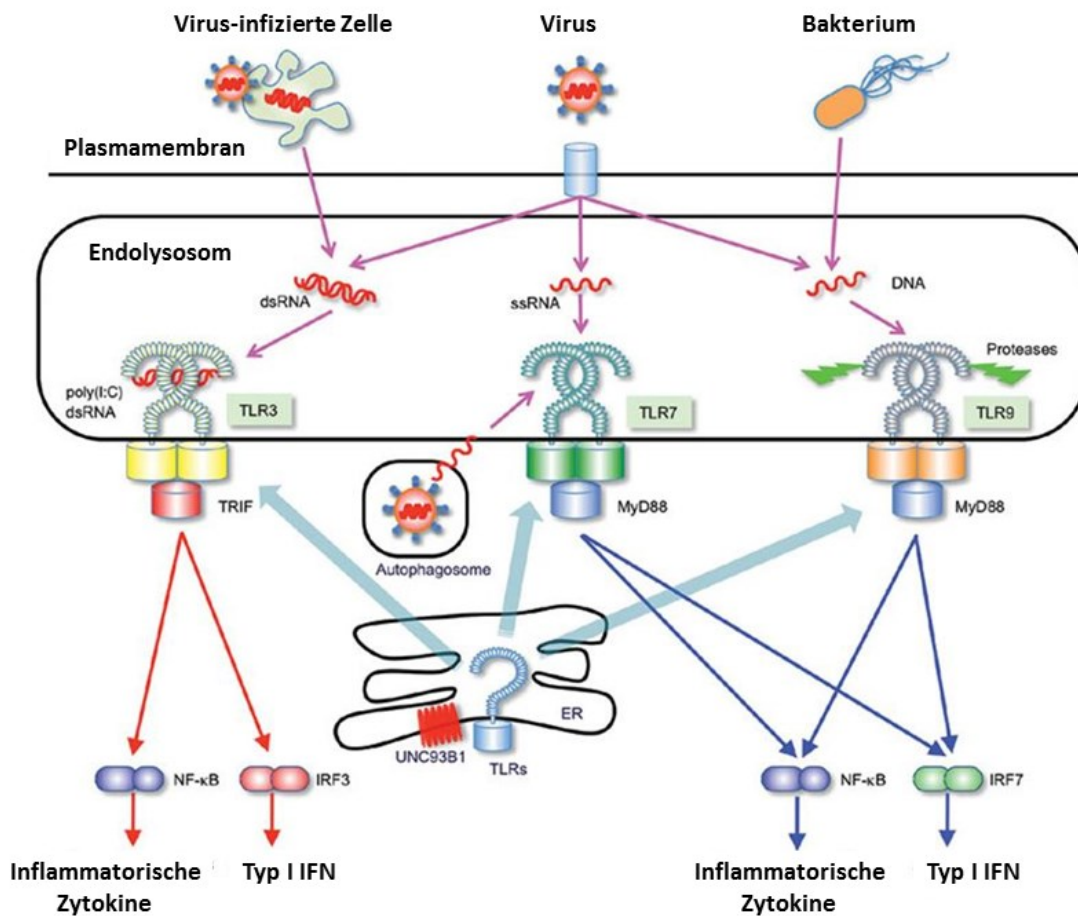
TLRs sind Typ I Transmembranrezeptoren, mit einer N-terminalen hufeisenförmigen Ligandenbindungsdomäne, einer einzelnen transmembranen Helix und einer C-terminalen zytoplasmatischen Signaldomäne (Bell *et al.*, 2003). Diese wird als Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet, an die zwei verschiedene Adaptermoleküle binden können, MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) und Trif (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ). MyD88 wird universell von allen TLRs verwendet, mit der Ausnahme von TLR3, welcher den Trif-abhängigen Signalweg aktiviert. TLR4 kann als einziger TLR beide Signalwege nutzen. In plasmazytoiden DCs aktiviert MyD88 die Transkriptionsfaktoren IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*) und NF- $\kappa$ B (*nuclear factor*

'*kappa-light-chain-enhancer*' of activated B-cells), was zur Induktion von Typ I IFN und pro-inflammatorischen Zytokinen führt (Kawai and Akira, 2010). Interessanterweise führt auch die Aktivierung von Trif zur Ausschüttung dieser Substanzen, obwohl das Adapterprotein sein Signal teilweise über andere Moleküle vermittelt (Abb. 1.2).

TLR3, TLR7 und TLR9, die im Zentrum dieser Arbeit stehen, befinden sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) und werden nach Stimulation mit ihren Liganden durch das UNC93B1 Protein in die Endolysosomen transportiert. In Mäusen mit einer Missense-Mutation in dem *UNC93B1* Gen, die sogenannten Triple D (3D)-Mäuse, führte die Stimulation mit den entsprechenden Liganden zu keiner Ausschüttung von Zytokinen und die Mäuse waren deutlich anfälliger für Infektionen mit verschiedenen Mikroben (Tabeta *et al.*, 2006).

Die TLR-Signalwege müssen genau reguliert werden, da eine zu starke Aktivierung zu Autoimmunerkrankungen oder Entzündungsreaktionen führen kann. Dies kann beispielsweise durch die Blockierung der Immunzellrekrutierung beziehungsweise Blockierung der Bindung mit den intrazellulären Adaptermolekülen oder durch Faktoren wie lösliches CD14 vermittelt werden, welches LPS binden kann (Anwar *et al.*, 2013).





**Abb. 1.2: Die Erkennung von PAMPs durch intrazelluläre TLRs und die Signalweiterleitung über Adaptermoleküle.** Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird über TLR3 erkannt und einzelsträngige RNA (ssRNA) über TLR7, während DNA von Bakterien oder Viren TLR9 aktiviert. TLR3 leitet sein Signal über das Adaptermolekül Trif weiter, wodurch es zur Aktivierung von NF-κB und IRF3 kommt, während die anderen beiden TLRs MyD88 binden, wodurch es zur Aktivierung von NF-κB und IRF7 kommt. In beiden Fällen führt dies zur Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und Typ I IFNs. Die TLRs werden vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch das Protein UNC93B1 in die Endosomen und Endolysosomen transportiert (modifiziert nach: Kawai and Akira, 2010).

## 1.2.2 Anti-tumorale Effekte der TLR-Stimulation

Aufgrund ihrer pro-inflammatorischen und immunaktivierenden Wirkung gelten TLR-Liganden als vielversprechende Tumortheraeutika und werden in vielen klinischen Studien getestet. Bisher wurden die beiden TLR2/TLR4-Liganden BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) und MPL (*Monophosphoryl-Lipid A*) sowie Imiquimod, ein TLR7-Ligand, von der FDA zugelassen (Vacchelli *et al.*, 2012). Unter dem Namen Aldara™ (3M Pharmaceuticals) wird Imiquimod für die topikale Behandlung von malignen Veränderungen der Haut wie dem Basalzellkarzinom, Lentigo Maligna und Aktinische Keratose eingesetzt. Andere Substanzen wie MGN1703, ein TLR9-Ligand, GLA (*glucopyranosyl lipid adjuvant*), ein TLR4-

Ligand, und Poly(I:CLC), ein TLR3-Ligand, werden in klinischen Studien getestet (Aranda *et al.*, 2014). Häufig scheinen sie jedoch besser als Adjuvans zu wirken, als wenn sie als Einzelwirkstoff verwendet werden (Steinhagen *et al.*, 2011). TLR-Liganden aktivieren Immunzellen, wodurch diese verstärkt die Tumorzellen angreifen oder weitere Immunzellen rekrutieren und aktivieren. Werden beispielsweise plasmazytoide DCs mit CpG-Oligonukleotiden (TLR9-Ligand) stimuliert, sezernieren sie große Mengen an Typ I IFNs und induzieren die Aktivierung von NK-Zellen. Diese sezernieren wiederum IFN- $\gamma$  und verstärken die Phagozytose durch Makrophagen (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

Zudem haben TLR-Liganden eine direkte Apoptose-induzierende und Proliferationshemmende Wirkung auf verschiedene Arten maligner Zellen (Klein *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2012). Wir konnten zeigen, dass die Behandlung einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie mit Poly(I:C) zum Zelltod *in vitro* und *in vivo* führte und die Tumorzellen pro-inflammatorische Zytokine und Typ I IFNs sezernierten, wodurch es zur Aktivierung von Monozyten und Rekrutierung von T<sub>H</sub>1-Zellen kam. Durch den Einsatz von Imiquimod wurde ebenfalls Tumorzelltod induziert, jedoch hatte dieser keinen immunstimulatorischen Effekt. Dies zeigt, wie unterschiedlich sich eine Stimulation verschiedener TLRs auswirken kann (Klein *et al.*, 2016). In einer anderen Studie wurden Leukämiezellen nach einer Behandlung mit Poly(I:C) susceptibler gegenüber Angriffen des Immunsystems. Sie wurden deutlich besser von DCs phagozytiert und von NK-Zellen lysiert (Lion *et al.*, 2011).

### 1.2.3 Pro-tumorale Effekte der TLR-Stimulation

Während die anti-tumorale Wirkung von TLRs hauptsächlich durch die Verwendung therapeutischer Substanzen untersucht wird, die das Immunsystem stimulieren sollen, zeigt sich ein pro-tumoraler Effekt der TLRs meistens durch endogene Liganden. Die tumorfördernde Wirkung von TLRs ist vor allem für TLR2 und TLR4 beschrieben. TLR4-defiziente Mäuse hatten ein geringeres Risiko Leberzellkarzinome oder Colitis-induzierte Tumore zu entwickeln (Fukata *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010). Bei einem metastatischen Tumormodell entwickelten sich die Tumore in TLR4<sup>-/-</sup> Mäusen langsamer, wodurch die Tiere länger überlebten (Lee *et al.*, 2010). Die Gruppe von Michael Karin zeigte weiterhin in einer Studie mit LLC (*Lewis lung carcinoma*), dass die Tumorzellen Substanzen sezernieren, die zu einer TLR2-abhängigen Stimulation von Makrophagen führte, wodurch es zur Sekretion von TNF- $\alpha$  und verstärkter Metastasenbildung kam (Kim *et al.*, 2009). Mäuse, denen das Adapterprotein MyD88 fehlte, entwickelten keine spontanen Darmtumore

(Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007) und waren ebenfalls vor chemisch induziertem Haut-, Darm- und Leberkarzinomen geschützt (Yu *et al.*, 2013a).

Häufig sind die pro-tumoralen Effekte durch TLR-Aktivierung auf den Tumorzellen selbst begründet. Eine verstärkte Expression von TLRs konnte für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen werden: Brust-, Kolorektal-, Lungen-, Prostata-, Pankreas-, Esopharynx-, und Leberkrebs sowie Melanom und Gliom (Ridnour *et al.*, 2013). Die Stimulation einer Darmkrebszelllinie mit dem TLR4-Liganden LPS führte zu einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber dem Angriff von zytotoxischen T-Zellen. Der Überstand der Tumorzellen inhibierte die Proliferation von T- und NK-Zellen (Huang *et al.*, 2005). Zudem konnte nach TLR4-Aktivierung eine verstärkte Tumorzellinvasion und Metastasierung beobachtet werden (Yu *et al.*, 2013a). Konform dazu führte die Blockade von TLR2 in Mäusen mit B16 Melanomen zu einer Reduktion von Lungenmetastasen und einem längeren Überleben der Tiere (Yang *et al.*, 2009).

Neben der Aktivierung von TLR2 und TLR4 führte auch die Stimulation von TLR3 und TLR9 in verschiedenen Tumorentitäten zu einer verstärkten Invasion und Metastasierung. Durch die Stimulation einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie mit Poly(I:C) kam es zu einer verstärkten CCL5 abhängigen Migration der Tumorzellen *in vitro* (Chuang *et al.*, 2012). Die TLR3-Stimulation in einer anderen Kopf-Hals-Tumorzelllinie induzierte zwar Zelltod in den Tumorzellen, verstärkte jedoch die Expression von tumorfördernden Genen und erhöhte die Wahrscheinlichkeit für Zellmigration (Matijevic and Pavelic, 2011). Auch die Stimulation einer humanen Prostata-Tumorzelllinie und einer Lungenkarzinomzelllinie mit TLR9-Liganden führte zu einer erhöhten Tumorzellinvasion, die durch Blockierung der endosomalen TLR-Signalweiterleitung gehemmt werden konnte (Ilvesaro *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2007).

### 1.3 Zielsetzung

Lange Zeit wurde angenommen, dass sich Toll-like Rezeptoren ausschließlich auf Immunzellen befinden, dort infiltrierende Pathogene wie Bakterien und Viren erkennen und dadurch eine effektive Immunantwort auslösen. Daher galten sie als neue Hoffnung in der Immuntherapie gegen Krebs. Es stellte sich heraus, dass diese Therapien nicht so erfolgreich waren, wie angenommen wurde, was darauf zurückzuführen ist, dass in der Tumormikroumgebung nicht nur Immunzellen, sondern auch nicht-hämatopoetische Zellen und die Tumorzellen selbst TLRs exprimieren können. Dadurch können TLR-Liganden eine tumorfördernde Wirkung haben, was vor allem für TLR2 und TLR4 beschrieben wurde, die

sich auf der Zelloberfläche befinden. Den endosomalen Rezeptoren TLR3, TLR7 und TLR9 werden vor allem anti-tumorale Eigenschaften zugeschrieben.

Im Kontrast dazu konnte in Vorarbeiten zu dieser Arbeit eine Tumorabstoßung in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden. Demnach scheinen endosomale Rezeptoren das Tumorstromawachstum in den Wildtyp (WT) Tieren zu begünstigen.

In dieser Arbeit sollen die molekularen, zellbiologischen und immunologischen Mechanismen aufgeklärt werden, die dieser anti-tumoralen Reaktion in den Knockoutmäusen zugrunde liegen. Dafür soll das hämatopoetische und das nicht-hämatopoetische Kompartiment des Tumorstromas untersucht werden. Zudem soll herausgefunden werden inwieweit das angeborene, beziehungsweise das adaptive Immunsystem, die Tumorabstoßung beeinflusst und die systemische mit der lokalen Immunantwort verglichen werden. Dazu kommen verschiedene Methoden und Modellsysteme zum Einsatz.

Um herauszufinden, welche TLR-Signale und anschließende Signaltransduktion die Tumorstromaprogression beeinflussen, werden weitere transgene Mausstämmen mit defekten TLRs oder mit defekter intrazellulärer Signalweiterleitung verwendet. Die Rolle des hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Stromas soll durch die Generierung von Knochenmarkchimären aufgeklärt werden. Zudem sollen die Zusammensetzung und der Aktivierungsstatus von Immunzellen zwischen den TLR-defizienten Mäusen und der WT-Situation verglichen werden. Dafür werden die Zellen *ex vivo* mittels Durchflusszytometrie und durch funktionelle Untersuchungen *in vitro* charakterisiert. Zellbiologische, histologische und molekularbiologische Untersuchungen sollen Aufschluss über die Beschaffenheit des Tumors zu verschiedenen Zeitpunkten in der Tumorentwicklung geben. Dafür wird die Genexpression durch qRT-PCR und Gene Arrays untersucht, verschiedene immunhistologische Methoden und 3D Lightsheet-Mikroskopie angewendet, sowie ELISA-Messungen durchgeführt. Diese Versuche werden durch den Einsatz von Depletionsantikörpern gegen spezifische Immunzellen *in vivo* ergänzt.

Das Projekt trägt zu dem grundlegenden Verständnis der Rolle endosomaler TLRs im Tumormikromilieu bei und die Untersuchung ihres pro-tumoralen Effekts ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien

Tab. 2.1: Zelllinien und deren Generierung

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
<b>MB49</b>	Murine Blasenkarzinomzelllinie. Hergestellt aus Basalzellepithel von C57BL/1crf-a' Mäusen durch neoplastische Transformation durch Dimeythylsulfoxid (Summerhayes and Franks, 1979)	Zur Verfügung gestellt von K. Esuvaranathan, University of Singapore, Singapur
<b>MOPC<sup>-</sup></b>	Murine Plattenepithelkarzinomzellen aus dem Oropharynx von C57BL/6 Mäusen (Spanos <i>et al.</i> , 2008). Sie wurden mit dem c-Ha-ras Onkogen immortalisiert. Andere Bezeichnung: MTEC	Zur Verfügung gestellt von John Lee, University of South Dakota, USA
<b>MOPC<sup>+</sup></b>	Murine Plattenepithelkarzinomzellen aus dem Oropharynx von C57BL/6 Mäusen. Sie wurden mit dem c-Ha-ras Onkogen immortalisiert und die MOPC <sup>+</sup> Zellen mit HPV-16 E6 und E7 transformiert.	Zur Verfügung gestellt von John Lee, University of South Dakota, USA
<b>MOPC<sup>-eGFP</sup></b>	Hergestellt aus MOPC <sup>-</sup> durch lentiviralen Transfer (Moses <i>et al.</i> , 2016)	Hergestellt in unserer Arbeitsgruppe
<b>TC1</b>	Murine Lungenkarzinomzelllinie. Hergestellt aus Lungenepithel von C57BL/6 Mäusen, immortalisiert mit dem c-Ha-ras Onkogen und transformiert mit HPV-16 E6 und E7 (Lin <i>et al.</i> , 1996)	Zur Verfügung gestellt von Zvi Fridlender, Hadassah Medical Center, Israel

## 2.2 Mäusstämme

Tab. 2.2: Mäusstämme und deren Herkunft

Mäusstamm	Herkunft/Haltung
C57BL/6J	Zentrales Tierlabor, UK-Essen
NMRI-Nude	
Triple D (3D)	
ASC <sup>-/-</sup>	
MyD88 <sup>-/-</sup>	
MyD88/Trif <sup>-/-</sup>	Zur Verfügung gestellt von C. Kirschning, Institut für Mikrobiologie, UK-Essen, Haltung im Zentralen Tierlabor, UK-Essen
Trif <sup>-/-</sup>	
TLR3/7/9 <sup>-/-</sup>	
TLR2/4 <sup>-/-</sup>	
TLR4 <sup>-/-</sup>	
TLR2/3/4/5/7/9 <sup>-/-</sup>	Zur Verfügung gestellt von S. Bauer, Phillips-Universität Marburg, Haltung im Zentralen Tierlabor, UK-Essen
TLR3/7 <sup>-/-</sup>	
TLR3/9 <sup>-/-</sup>	
C57BL/6J WT	Zur Verfügung gestellt von A. Bleich, MHH Hannover, Haltung in der Tierhaltung der MHH
C57BL/6J keimfrei	

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Herstellungsort
96-Well Flachbodenplatte	Greiner bio-one	Frickenhausen, Dtl.
96-Well Rundbodenbodenplatte	Greiner bio-one	Frickenhausen, Dtl.
96-Well Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorb)	Thermo Scientific	Schwerte, Dtl.
BD Microtainer Serumröhrchen	Becton Dickision	Heidelberg, Dtl.
Butterfly	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
Deckgläschen	Engelbrecht	Edermünde, Dtl.
Faltenfilter 595 1/2	Whatman GmbH	Dassel, Dtl.
FEATHER® Mikrotomklingen C35	pfm medical	Köln, Dtl.
Gewebekulturplatte 6 Well, 24 Well	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
Gussförmchen Cryomold® 10x10x5mm	Sakura Finetek	Staufen, Dtl.
ImmEdge Wachsstift	Vector	Peterborough, England
Kanülen (23G, 25G, 27G)	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.

**Tab. 2.3:** Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Herstellungsort</b>
<b>LD MACS Säulen</b>	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Dtl.
<b>LightCycler Kapillaren (20 µl)</b>	Roche Applied Science	Wiesbaden, Dtl.
<b>LS MACS Säulen</b>	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Dtl.
<b>Multiply-µStrip pro 4er Kette mit Deckel</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
<b>Superforst Plus Objektträger</b>	R. Langenbrink	Emmendingen, Dtl.
<b>Petrischale</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
<b>Pipetten 5ml, 10ml, 25ml</b>	Greiner bio-one	Frickenhausen, Dtl.
<b>Pipettenspitzen 10 µl, 200µl, 1000µl</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
<b>Pipettenspitzen Biosphere® 10 µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
<b>Pistillen HP-1,5 (Stößel)</b>	Kisker-Biotech	Steinfurt, Dtl.
<b>Reaktionsgefäße 1,5 ml</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
<b>Rundbodenröhrchen</b>	BD Falcon	Heidelberg, Dtl.
<b>Spritzen (BD Plastipak) 1ml</b>	Becton Dickision	Heidelberg, Dtl.
<b>Spritzen (BD Discardit II) 2 ml, 10 ml</b>	Becton Dickision	Heidelberg, Dtl.
<b>Spritzen inkl. Kanülen (Ommican® F)</b>	B.Braun	Melsungen, Dtl.
<b>Zellkulturflaschen T25, T75, T175</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
<b>Zellsieb Cell Trics (100µm Poren)</b>	Sysmec	Norderstedt
<b>Zentrifugenröhrchen 15 ml</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Dtl.
<b>Zentrifugenröhrchen 50 ml</b>	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Dtl.

## 2.4 Geräte

**Tab. 2.4:** Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Herstellungsort</b>
<b>Autoklav VX75</b>	Systec	Linden, Dtl.
<b>Axioskop 2 Mikroskop</b>	Zeiss	Jena, Dtl.
<b>AxioCam MRc 5</b>	Zeiss	Jena, Dtl.
<b>BioPhotometer</b>	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Dtl.
<b>Caliper 100 mm</b>	Roeser Medical	Bochum, Dtl.
<b>Casy-Zellzähler Modell TT</b>	Roche Innovastis	Reutlingen, Dtl.
<b>Durchflusszytometer Canto II</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
<b>ELISA-Washer ELx50</b>	Biotek Instruments	Bad Friedrichshall, Dtl.
<b>Finnpipette 30-300 µl</b>	ThermoScientific	Bonn, Dtl.
<b>Inkubator Thermo Typ HERAcell 240 und 240i</b>	ThermoScientific	Bonn, Dtl.
<b>Inkubator und Schüttler TH30</b>	Edmund Bühler	Hechingen, Dtl.

**Tab. 2.4:** Geräte (Fortsetzung)

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Herstellungsort</b>
<b>Inversmikroskop CK2-TR</b>	Olympus	Hamburg
<b>Inverses Lichtmikroskop IX51</b>	Olympus	Hamburg, Dtl.
<b>Kryomikrotom HM 505 N</b>	Techno-Med	Bielefeld, Dtl.
<b>LaVision BioTec Ultramikroskop</b>	Olympus	Hamburg
<b>LightCycler</b>	Roche Applied Science	Wiesbaden, Dtl.
<b>MACS MultiStand</b>	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Dtl.
<b>Mikroküvette G1.0</b>	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Dtl.
<b>Mikrozentrifuge 5415C</b>	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Dtl.
<b>Mikrozentrifuge "Sprout"</b>	Kisker-Biotech	Steinfurt, Dtl.
<b>Multipette E3x</b>	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Dtl.
<b>Multipette Xplorer</b>	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Dtl.
<b>MyCycler PCR Maschine</b>	Bio-Rad	München, Dtl.
<b>Pipetten 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl</b>	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Dtl.
<b>Pipettus</b>	Hirschmann	Eberstadt, Dtl.
<b>QuadroMACS™ Separator</b>	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Dtl.
<b>Scotsman AF80 Flockeneisbereiter</b>	Scotsman	Vernon Hills, USA
<b>Seven Easy pH-Meter</b>	Mettler-Toledo	Giessen, Dtl.
<b>Sterilbank MSC-Advantage</b>	Thermo Scientific	Bonn, Dtl.
<b>Synergy 2 Multi-Detection-Reader</b>	Biotech Instruments	Bad Friedrichshall, Dtl.
<b>VET Isis GT420 Tierrasierer</b>	Aesculap Suhl GmbH	Suhl, Dtl.
<b>Vortex Mixer VTX-300L</b>	Kisker-Biotech	Steinfurt, Dtl.
<b>Zentrifuge LC Carousel</b>	Roche Applied Science	Wiesbaden, Dtl.
<b>Zentrifuge MIKRO 200R</b>	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Dtl.
<b>Zentrifuge ROTINA 420 R</b>	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Dtl.
<b>Zentrifuge Sigma 2K15</b>	B.Braun	Melsungen, Dtl.
<b>Zentrifuge UNIVERSAL 320</b>	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Dtl.



## 2.5 Chemikalien

Tab. 2.5: Chemikalien und andere Substanzen

Chemikalien	Hersteller	Herstellungsort
2-Propanol Ph. Eur., reinst	AppliChem	Darmstadt, Dtl.
A/A (Antibiotikum/Antimykotikum)	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe, Dtl.
Aceton reinst	AppliChem	Darmstadt, Dtl.
Agarosepulver	Biozym	Hess. Oldendorf, Dtl.
Aminoethylcabazol (AEC)	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe, Dtl.
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
Aqua Braun	B.Braun	Melsungen, Dtl.
Assay Diluent (ELISA)	eBioscience	Frankfurt, Dtl.
BD CST Beads	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
BD FACS Flow	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
BD FACS Rinse Solution	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
BD FACS Shutdown Solution	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
CasyTon	Roche Innovastis	Bielefeld, Dtl.
Cell Tracker™ Deep Red	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe, Dtl.
Choleratoxin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
DAPI	BioLegend	Fell, Dtl.
Dibenzyl Ether	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
DMEM mit L-Glutamine, High-Glucose, Na-Pyruvate	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe, Dtl.
dNTP-Mix, 10 mM	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe, Dtl.
EGF murin	Biochrom	Berlin, Dtl.
Eisessig	Merck	Darmstadt, Dtl.
Eosin B	Carl Roth	Karlsruhe, Dtl.
Ethanol 70% v/v, vergällt	Merck	Darmstadt, Dtl.
Ethanol 96% v/v, vergällt	Merck	Darmstadt, Dtl.
Ethanol 99,5%, Ph.Eur., reinst	Carl Roth	Karlsruhe, Dtl.
Fluoprep	BioMerieux	Nürtingen, Dtl.
Forene 100% (V/V)	AbbVie	Ludwigshafen, Dtl.
Formalin 10%	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom	Berlin, Dtl.
HamsF12	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe, Dtl.
Hematoxylin Instand	Shandon ThermoScientific	Schwerte, Dtl.
Insulin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
Kaiser Glycerin-Gelantine	Merck	Darmstadt, Dtl.
Kaliumchlorid	AppliChem	Darmstadt, Dtl.
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Dtl.
Ketamin 10%	Ceva Tiergesundheit	Düsseldorf, Dtl.

**Tab. 2.5:** Chemikalien und andere Substanzen (Fortsetzung)

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Herstellungsort</b>
<b>L-Ascorbinsäure</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
<b>Lyovec</b>	Invivogen	Toulouse, Frankreich
<b>Mausserum</b>	Dianova	Hamburg, Dtl.
<b>Natriumazid</b>	AppliChem	Darmstadt, Dtl.
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth	Kalsruhe, Dtl.
<b>Natriumcitrat</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b>	Merck	Darmstadt, Dtl.
<b>Paraformaldehyd</b>	Merck Millipore	Darmstadt, Dtl.
<b>Penicillin</b>	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe
<b>Rinder Albuminserum (BSA)</b>	AppliChem	Darmstadt, Dtl.
<b>RNaseA (DNase frei)</b>	Roche	Mannheim, Dtl.
<b>Rotihistokitt-II Eindeckmittel</b>	Carl Roth	Kalsruhe, Dtl.
<b>RPMI 1640</b>	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe
<b>Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 M</b>	AppliChem	Darmstadt, Dtl.
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Merck	Darmstadt, Dtl.
<b>StemPro® Accutase®</b>	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe, Dtl.
<b>Streptavidin-HRPO</b>	Dianova	Hamburg, Dtl.
<b>Streptomycin</b>	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe
<b>Superskript II</b>	ThermoFisher scientific™	Karlsruhe
<b>Tetrahydrofuran (THF)</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
<b>Tetramethylbenzidin (TMB)</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
<b>Tissue-Tek® Einbettmedium</b>	Sakura Finetek	Staufen, Dtl.
<b>Tri-Iodo-Thyronine</b>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Dtl.
<b>Tris Base</b>	Carl Roth	Kalsruhe, Dtl.
<b>Trypsin/EDTA (TE)</b>	Pan Biotech	Aidenbach, Dtl.
<b>Tween® 20</b>	AppliChem	Darmstadt, Dtl.
<b>Viability Dye eFluor 506, 660</b>	eBioscience	Frankfurt, Dtl.
<b>Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	Merck	Darmstadt, Dtl.
<b>Xylazin 2%</b>	Ceva Tiergesundheit	Düsseldorf, Dtl.
<b>Xylol 2.5L</b>	Carl Roth	Karlsruhe, Dtl.
<b>Zombie Green Fixable Viability</b>	BioLegend	Fell, Dtl.

## 2.6 Puffer und Lösungen

**Tab. 2.6:** Zusammensetzung von Puffer und weitere Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<b>Azid-PBS</b>	150 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 8,1 mM Natriumdihydrogenphosphat 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 15 mM Natriumazid pH 7,4
<b>Blockierungspuffer (R&amp;D ELISA)</b>	1 % BSA 0.2 M Saccharose 7,7 mM Natriumazid 1x PBS
<b>ELISA-Waschpuffer</b>	0,05 % Tween 20 in PBS
<b>10x PBS (phosphate buffer saline)</b>	150 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 8,1 mM Natriumdihydrogenphosphat 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,3
<b>P/S</b>	10000 IU/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin
<b>Reagent Diluent (R&amp;D ELISA)</b>	1 % BSA in PBS pH 7,3
<b>10x TBS (Tris buffered saline)</b>	20 mM Tris 1,5 M Natriumchlorid pH 7,2-7,4

## 2.7 Zellkulturmedien

Tab. 2.7: Zellkulturmedien für die verschiedenen Zelltypen

Medium	Zusammensetzung
<b>Zellkulturmedium I (Immunzellen)</b>	RPMI 1640 1 % P/S 10 % FCS
<b>Zellkulturmedium II (TC1, MB49)</b>	DMEM 1 % P/S 10 % FCS
<b>Zellkulturmedium III (MOPC Zellen)</b>	DMEM und HamsF12 (3:1) 10 % FCS 1 % P/S 0,0084 µg/ml Cholera toxin 5 µg/ml Apo-Transferrin 5 µg/ml Insulin 0,00136 µg/ml Triiodo-Thyronine 0,5 µg/ml Hydrocortison 5 µg/ml EGF
<b>Zellkulturmedium IV (Fibroblasten)</b>	100 ml DMEM 1 % P/S 10 % FCS 50 µg/ml Vitamin C
<b>Zellkulturmedium V (bmDC)</b>	500 ml DMEM 10 % FCS 1 % A/A 1 % P/S 2 µl 50 mM β-Mercaptoethanol

## 2.8 Stimulanzen

Tab. 2.8: Stimulanzen für *in vitro* Versuche

Stimulus	Rezeptor	Verwendung	Hersteller
<b>Pam3CSK4</b>	TLR1/2	1 µg/ml	Invivogen
<b>Pst1</b>	TLR2	10 µg/ml	Lionex
<b>LPS-SM</b>	TLR4	0.1 µg/ml	Invivogen
<b>Sa19</b>	TLR13	10 nmol/ml	IBA GmbH
<b>IFN-γ (murin)</b>	IFNGR	1000 U/ml	Peprtech
<b>GM-CSF</b>	CD116	100 U/ml	Peprtech

## 2.9 Kits

Tab. 2.9: Kits

Kit	Hersteller	Herstellungsort
<b>Annexin V-PE/ 7AAD</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
<b>APO-DIREKT™ TUNEL Kit</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
<b>BD Cytofix/Cytoperm™ Kit</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
<b>BD OptEIATM Mouse IFN-γ ELISA Set</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
<b>BD OptEIATM Mouse IL-10 ELISA Set</b>	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
<b>CD45R (B220) MicroBeads, murin</b>	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Dtl.
<b>Maxima™ SYBR™ Green qPCR Master Mix</b>	ThermoScientific	Bonn, Dtl.
<b>mouse IL-6 DuoSet® ELISA Kit</b>	R&D Systems	Wiesbaden, Dtl.
<b>mouse IL-12p70 DuoSet® ELISA Kit</b>	R&D Systems	Wiesbaden, Dtl.
<b>mouse IL-24 DuoSet® ELISA Kit</b>	R&D Systems	Wiesbaden, Dtl.
<b>mouse KC DuoSet® ELISA Kit</b>	R&D Systems	Wiesbaden, Dtl.
<b>PanT Isolationskit</b>	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Dtl.
<b>Rneasy® Mini Kit</b>	Quiagen	Hilden, Dtl.
<b>VenorGeM Mykoplasmakit</b>	Minerva BioLabs	Berlin, Dtl.

## 2.10 Antikörper

Tab. 2.10.1: Histologie primäre Antikörper

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
<b>Caspase (aktiv)</b>	rabbit polyclonal	/	/	1:100	R&D Systems
<b>CD4</b>	ratIgG2a	/	RM4-5	1:500	BD Bioscience
<b>CD8α (Ly2)</b>	rat IgG2a, lamda	/	KT15	1:500	AbD Serotec/BioRad
<b>CD11b</b>	rat IgG2b	/	M1/70.15.1	1:1000	Biosource
<b>CD11c</b>	hamster IgG 1	RPE	HL3	1:20	BD Bioscience
<b>CD31</b>	rat IgG2a	/	MEC13.3	1:1000	BD Bioscience
<b>CD45</b>	rat IgG2b	FITC	30F11	1:50	BioLegend
<b>CD140b (PDGFβ)</b>	rat	/	/	1:50	eBioscience
<b>CD209a (DC-SIGN)</b>	mouse IgG2c	eFlour 660	MMD3	1:40	eBioscience
<b>Desmin</b>	rabbit	/	DE-U-10	1:600	Abcam
<b>FoxP3</b>	rat IgG2a	/	FJK-16s	1:200	eBioscience
<b>Gr1 (Ly6C/G)</b>	rat IgG2b	/	RB6-8C5	1:400	BD Bioscience
<b>Granzyme B</b>	poly rabbit	/	/	1:50	Abcam
<b>α-SMA</b>	mouse	Cy3	1A4	1:400	Sigma-Aldrich

## Material

**Tab. 2.10.2:** Durchflusszytometrie primäre Antikörper

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Verwendung (µg/ml)	Hersteller
CD4	rat IgG2a	V450	RM4-5	4	BD Bioscience
CD8	rat IgG2a	V500	53-6.7	4	BD Bioscience
CD11b	rat IgG2a	PE-Cy7	3A33	2	Abcam
CD44	rat IgG2b	APC-Cy7	IM7	5	BD Bioscience
CD45R (B220)	rat IgG2a	APC	RA3-6B2	3.3	Miltenyi
CD62L	rat IgG2a	FITC	Mel-14	5	eBioscience
CD69	hamster IgG1 λ	/	H1.2F3	2.5	BD Bioscience
CD80	hamster IgG	APC	16-10A1	10	BioLegend
CD86	rat IgG2a	V450	B7-2	10	BD Bioscience
IFN-γ	rat IgG1	/	RMMG-1	25	Millipore
Ly6C	rat IgG2a	PE	ER-MP20	2	Novus
Ly6G	rat IgG2a	PerCP/Cy5.5	1A8	2	BioLegend
MHC-II	rat IgG2a	FITC	2G9	50	BD Bioscience

**Tab. 2.10.3:** sekundäre Antikörper für die Histologie oder Durchflusszytometrie

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
donkey α rabbit	IgG (H+L)	Alexa488	/	1:200	Dianova
donkey α rabbit	IgG (H+L)	A594	/	1:800	Invitrogen
donkey α goat	IgG (H+L)	A594	/	1:700	Invitrogen
donkey α rat	IgG (H+L)	Cy3	/	1:400	Dianova
rabbit α rat	IgG (H+L)	HRPO	/	1:100	Dianova
goat α rabbit	IgG (H+L)	HRPO	/	1:100	Dianova
goat α rabbit	IgG (H+L)	Cy3	/	1:400	Dianova
goat α rat	IgG (H+L)	Alexa 488	/	1:200	molecular probes
goat α rat	IgG (H+L)	Alexa 488	/	1:700	Invitrogen
donkey α rat	IgG (H+L)	Cy3	/	1:100	Dianova
goat α hamster	IgG (H+L)	FITC	/	1:100	Dianova

## Material

**Tab. 2.10.4:** Isotyp-Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Konzentration (µg/ml)	Hersteller
<b>Isotyp</b>	rat IgG2a	V450	R35-95	200	BD Bioscience
<b>Isotyp</b>	rat IgG2a	V500	R35-96	200	BD Bioscience
<b>Isotyp</b>	rat IgG2a	FITC	RTK2758	500	BioLegend
<b>Isotyp</b>	rat IgG2a,k	PE-Cy7	R35-95	100	BD Bioscience
<b>Isotyp</b>	rat IgG2a	APC	54447	25	R&D Systems
<b>Isotyp</b>	rat IgG2a	PE	RTK2758	200	BioLegend
<b>Isotyp</b>	rat IgG2a	PerCP/Cy5.5	R35-95	100	BD Bioscience
<b>Isotyp</b>	hamster IgG	APC	HTK888	200	BioLegend

**Tab. 2.10.5:** Antikörper für *in vivo* Anwendungen

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Verwendung	Hersteller
<b>CD4 (Depletion)</b>	rat IgG2a	/	GK1.5	100 µg/Injektion	Bio-X-cell
<b>CD8 (Depletion)</b>	rat IgG2a	/	2.43	100 µg/Injektion	Bio-X-cell
<b>Isotyp (Depletion)</b>	rat IgG2b	/	LTF-2	100 µg/Injektion	Bio-X-cell
<b>CD31</b>	rat IgG2a, κ	Alexa Fluor 647	MEC13.3	10 µg/Maus	BioLegend

## 2.11 Primer

**Tab. 2.11:** Murine Primersequenzen für die qRT-PCR

Primer		Sequenz ( 5' - 3' )	Annealing Temp (°C)	Amplicon (bp)
<b>m_β-Actin</b>	forward	ACCAACTGGGACGACATGGAGAA	60	380
	reverse	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC		
<b>m_C1ra</b>	forward	CGACAATGCCAACCCCAAAA	60	119
	reverse	CATCTTGGCGGTAGTCTGGG		
<b>m_C3</b>	forward	CAATGTCCTACGGCTGGAGAG	60	127
	reverse	TGTCTTCTCACTGGTCAGCAC		
<b>m_C3ar1</b>	forward	CCCCAAGACATTGCCTCCAT	60	117
	reverse	GACTGTGTTACGGTCGTCT		
<b>m_C4b</b>	forward	AGGTCTGTGTGTAGCCAAGC	60	100
	reverse	TTCAAAGTCTCAAAGCGGC		

**Tab. 2.11:** Murine Primersequenzen für die qRT-PCR (Fortsetzung)

Primer		Sequenz ( 5' - 3' )	Annealing Temp (°C)	Amplicon (bp)
m_C5ar1	forward	AGGTCTCTCCCCAGCATCAT	60	83
	reverse	GTCGTGGACGGAGTGAAAGT		
m_IFNg	forward	ATTAGCCAAGACTGTGATTGCG	60	70
	reverse	CTGAGTTCAGTCAGCCGCTT		
m_IL6	forward	GAGTGGCTAAGGACCAAGACC	60	96
	reverse	AACGCACTAGGTTTGCCGA		
m_IL8	forward	CCCCATCCCCATTTCTTGAT	60	122
	reverse	AGCCCATAGTGGAGTGGGATA		
m_IL24	forward	ACCAGCGGTTTTTGCTGTTC	60	105
	reverse	TCTGCATCCAGGTCAGGAGA		

## 2.12 Software

**Tab. 2.12:** Software

Software	Hersteller	Herstellungsort
Adobe Illustrator CS5	Adobe System GmbH	München, Dtl.
Adobe Photoshop CS5	Adobe System GmbH	München, Dtl.
AxioVision 4	Zeiss	Jena, Dtl.
BD FACSDiva	BD Bioscience	Heidelberg, Dtl.
Cell F	Olympus	Hamburg, Dtl.
Gen5	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall, Dtl.
GIMP 2.6.7	The GIMP Development Team	<a href="http://gimp.org">http://gimp.org</a>
GrappPad Prism V 4.00	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
ImageJ V1.48v	Wayne Rasband, National Institut of Health	Bethesda, USA
Imaris 8.0.2 Software	Imaris	Köln, Dtl.
LightCycler 3	Roche Apllied Science	Wiesbaden, Dtl.
Microsoft Office 2010	Microsoft GmbH	Unterschleißheim, Dtl.



### 3 Methoden

#### 3.1 Tierexperimente

##### 3.1.1 Mausstämme

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalens genehmigt und entsprechend der Tierschutzkommission der Universität Duisburg-Essen und unter Berücksichtigung der vom „Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 der TVT“ festgelegten Kriterien durchgeführt. Die Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien (SPF-) Bedingungen in Typ III-Käfigen mit Filterhaube gehalten. Sie erhielten Zuchtfutter und unterlagen einem 12-Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus. Es wurden sechs bis zwölf Wochen alte C57BL/6J und athymische Nacktmäuse (NMRI-Nude) verwendet, welche im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gezüchtet wurden. Die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse, sowie TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2/4<sup>-/-</sup>, TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>, Trif<sup>-/-</sup>, MyD88/Trif<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> und 3D-Mäuse wurden im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Carsten Kirschning der medizinischen Mikrobiologie am Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt und die TLR-Doppel-KO Mäuse TLR3/7<sup>-/-</sup> sowie TLR3/9<sup>-/-</sup> von Prof. Dr. Stefan Bauer der Philipps-Universität in Marburg. Diese Tiere wurden ebenfalls im Zentralen Tierlabor unter den oben beschriebenen Bedingungen gehalten. Die keimfreien C57BL/6J Mäuse und die WT C57BL/6J Kontrolltiere wurden in der Tierhaltung der Medizinischen Hochschule Hannover gezüchtet und der Versuch dort in Kooperation mit Prof. Dr. André Bleich durchgeführt. Die keimfreien Mäuse wurden in speziellen Mikroisolatoren (Han-Gnotocages) gehalten. Bei den WT Kontrolltieren handelt es sich um ursprünglich keimfreie Tiere, die mit einer Schädler Flora wiederbesiedelt wurden und unter SPF-Bedingungen gehalten wurden.

##### 3.1.2 Tumormodelle

Für den Großteil der Versuche wurden die Tumorzellen subkutan (s.c.) in die dorsale Flanke der Maus injiziert. Dabei handelt es sich um ein etabliertes Modell, da durch den leicht zugänglichen Bereich das Tumorwachstum präzise kontrolliert werden kann. Um die Messung vor allem bei kleinen Tumoren zu optimieren, wurde das Fell in dem Bereich der zu erwartenden Tumorentwicklung rasiert. Die Tiere wurden dafür mit 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin in 0,9 % NaCl anästhesiert. Danach wurden, wenn nicht anders erwähnt, pro Maus  $5 \times 10^5$  Tumorzellen in 100 µl PBS mit einer 27 G Kanüle injiziert. Um die Rolle von Fibroblasten *in vivo* zu untersuchen, wurden  $2,5 \times 10^5$  WT oder TLR3/7/9<sup>-/-</sup>

Fibroblasten zusammen mit  $5 \times 10^5$  MOPC- Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS s.c in WT und TLR3/7/9 $^{-/-}$  Mäuse injiziert (1:2 Verhältnis). Die Tumorgröße wurde mittels eines Messschiebers in zwei Dimensionen bestimmt, wodurch das Tumolvolumen folgendermaßen berechnet wurde:

$$V_{Tumor} = a^2 \times b \times \frac{\pi}{6}$$

Das Experiment wurde spätestens bei einem Tumordurchmesser von  $\geq 2$  cm beendet.

Zudem wurde das Tumorwachstum nach orthotoper Injektion untersucht. Da es sich bei der MOPC Zelllinie um Krebszellen des Kopf-Hals-Bereiches handelt, erfolgte die orthotope Injektion in den Mundboden. Die Mäuse wurden anästhesiert (s.o.), dann wurden  $5 \times 10^5$  MOPC- Zellen in 30  $\mu\text{l}$  PBS injiziert. Das Gewicht wurde alle 1 bis 2 Tage kontrolliert, um Gewichtsverlust durch verminderte Nahrungsaufnahme zu detektieren. Das Experiment wurde beendet, sobald das Gewicht auf unter 20 % des Anfangswertes sank.

### 3.1.3 Generierung von Chimären

Bei Chimären handelt es sich um Organismen mit genetisch unterschiedlichen Zellen. Sie werden häufig verwendet, um die Rolle einer bestimmten Zellpopulation zu untersuchen. Hier wurden sie generiert, um die Bedeutung von Toll-like-Rezeptoren auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen in der Tumorentwicklung zu untersuchen. Dafür musste das Knochenmark der Empfängertiere durch Bestrahlung mit 9,5 bis 10,5 Gray einer Gammabestrahlungsanlage des Typs Philips Kobalt-60 zerstört werden. Nach 24 Stunden wurde  $5 \times 10^6$  Knochenmarkzellen in 200  $\mu\text{l}$  PBS intravenös injiziert, welches aus Spendermäusen isoliertes worden war. Um eine vollständige Regenerierung des Immunsystems zu gewährleisten, lagen mindestens acht Wochen zwischen Bestrahlung und nachfolgenden Experimenten.

### 3.1.4 Depletion von T-Zellen

Um T-Zellen *in vivo* zu eliminieren, wurden spezifische monoklonale CD4 und CD8 Depletionsantikörper verwendet. Einmal wöchentlich wurde 100  $\mu\text{g}$  des Antikörpers in 200  $\mu\text{l}$  0,9 % NaCl pro Maus intraperitoneal injiziert. In den Kontrollgruppen wurde der entsprechende Isotyp verabreicht. Die Depletion der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie im peripheren Blut überprüft. Dafür wurde von der lateralen Schwanzvene ein Blutstropfen abgenommen und dieser in ein vorbereitetes Gefäß mit 5  $\mu\text{l}$  3,8 % Natriumcitrat überführt, um zu verhindern, dass das Blut koaguliert. Die Durchflusszytometrie wurde wie unter Kapitel 3.2.5 beschrieben durchgeführt.

### 3.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in 25 bis 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den entsprechenden Medien kultiviert (siehe Tabelle 2.7). Die Passagierung erfolgte zweimal wöchentlich bei etwa 80 % Wachstumskonfluenz. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde mit FCS gestoppt und die Zellen zentrifugiert (300 g, 7 min, 4°C). Nachdem sie in Zellkulturmedium resuspendiert wurden, wurde die Zellkonzentration mittels des Casy Zellzählers bestimmt. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Wachstumsrate in dem benötigten Medium für die nächste Passage eingesetzt. Die Verwendung von mykoplasmafreien Zellen wurde durch die regelmäßige Überprüfung durch ein PCR Kit (VenorGeM, Minerva BioLabs) gewährleistet. Für Experimente wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Accutase® abgelöst und wie oben beschrieben gezählt.

#### 3.2.2 Sphäroidassay mit murinen Hautfibroblasten

Murine Fibroblasten wurden aus der Haut von WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen gewonnen. Dafür wurden naive Mäuse getötet, das Fell auf dem Rücken rasiert und anschließend mit Enthaarungscreme vollständig entfernt. Die Haut wurde präpariert, mit Ethanol desinfiziert und mit PBS gewaschen. In einer Petrischale mit 10 ml Zellkulturmedium IV (siehe Tabelle 2.7) wurde die Haut in stecknadelgroße Stücke geschnitten. 3 bis 6 der kleinen Stücke wurden mit der Unterhaut nach unten gleichmäßig in ein Well einer 6-Well-Platte mit etwas Zellkulturmedium IV verteilt. Überschüssiges Medium wurde abgesaugt, sodass nur ein dünner Flüssigkeitsfilm den Boden bedeckte. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden 3 ml Fibroblastenmedium vorsichtig in jedes Well gegeben. Die Hautstücke wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> ca. 2 Wochen inkubiert, bis Fibroblasten aus den Gewebestücken auswanderten. Die Hautstücke wurden entfernt, die Fibroblasten mit Accutase® abgelöst und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Ab der folgenden Passage wurden sie in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig ausgetauscht und das Zellwachstum überprüft.

Für die Herstellung von Sphäroiden wurden 1,5-prozentige Agaroseplatten angefertigt. Dafür wurden 100 µl warmes RPMI-Medium mit 1,5 % Agarose in 96-Flachbodenplatten gegeben und für eine Stunde steril trocknen gelassen. Pro Well wurden insgesamt 75.000 Zellen in 200 µl Medium gegeben. Die Kokultur von MOPC<sup>-</sup> oder MOPC<sup>-GFP</sup> Zellen zusammen mit WT oder TLR<sup>-/-</sup> Fibroblasten erfolgte in einem 1:2 Verhältnis (1 Fibroblast : 2

Tumorzellen) für 4 Tage. Die Sphäroide wurden mit dem inversen Mikroskop Olympus IX51 und der Software Cell F (Olympus) in der Augenklinik der Universitätsklinik Essen fotografiert.

### **3.2.3 Isolation und Behandlung von murinen Immunzellen**

#### **3.2.3.1 Zellisolation aus verschiedenen Geweben**

Für die Isolation aller Gewebe wurden die Mäuse durch eine Überdosis des Inhalationsanästhetikums Isofluran getötet und die Gewebe zügig entnommen.

Die Isolation peripherer Blutleukozyten erfolgte aus der Aorta. Das Peritoneum wurde geöffnet und das Blut mit einer 1 ml Spritze und einer 25 G Kanüle entnommen. Das Blut wurde in ein Gefäß mit 20 % (v/v) 3,8 % Natriumcitrat überführt, um die Koagulation des Blutes zu verhindern. Die Erythrozyten wurden durch hypertonen Schock lysiert. Dafür wurden 200 µl destilliertes Wasser für 10 Sekunden zu dem Blut gegeben und auf dem Vortexer gemischt. Die Osmolarität wurde durch Zugabe der gleichen Menge an 2x PBS wiederhergestellt. Nach der Lyse wurden die Zellen gewaschen und für weitere Analysen verwendet.

Um die Zellen der Milz zu isolieren, wurden sie in eine Petrischale mit PBS überführt und mit dem Stempel einer 10 ml Spritze vorsichtig zerdrückt. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden sie mit einer 23 G Kanüle und einer 2 ml Spritze mehrfach resuspendiert und anschließend zentrifugiert (460 g, 10 min). Die Erythrozytenlyse wurde wie oben beschrieben mit 1 ml destilliertem Wasser und 2x PBS durchgeführt. Entstandene Gewebeklumpen wurden durch einen 100 µm Zellfilter entfernt. Die Zellzahl wurde wie beschrieben bestimmt und die Zellen für weitere Analysen verwendet.

Knochenmarkzellen wurden aus Femur und Tibia isoliert. Die Haut und die Muskeln wurden von den Hinterbeinen der Tiere entfernt und diese entnommen. Restliche Muskelfasern wurden durch vorsichtiges Reiben mit Zellstoff entfernt. Der saubere Knochen wurde mit Ethanol desinfiziert und in PBS überführt. Die Isolation des Knochenmarkes erfolgte in einer Petrischale mit PBS. Da es sich bei Femur und Tibia um Röhrenknochen handelt, wurden sie an beiden Enden aufgeschnitten und durch die Positionierung einer 23 G Kanüle in die Öffnung wurde das Knochenmark mit PBS herausgespült. Die entstandene Zellsuspension wurde mit einer 23 G Kanüle resuspendiert und zentrifugiert (460 g, 10 min). Die Erythrozytenlyse erfolgte wie bei den Milzzellen beschrieben. Um Knochensplitter zu entfernen, wurden auch hier Zellsiebe mit 100 µm Porengröße verwendet und anschließend die Zellzahl wie oben beschrieben bestimmt. Die Zellen wurden entweder in Medium

aufgenommen, wenn sie für weitere *in vitro* Versuche verwendet werden sollten, oder in PBS, wenn sie direkt für *in vivo* Versuche verwendet wurden.

Lymphknoten wurden aus der Leiste entnommen, da es sich in dem hier verwendeten subkutanen Tumormodell dabei um die drainierenden Lymphknoten handelt. Die Lymphknoten wurden in kleine Stücke geschnitten und mit dem Stempel einer 10 ml Spritze zerkleinert. Die Zellsuspension wurde direkt mit einem 100 µm Zellsieb gefiltert und gezählt.

### 3.2.3.2 **Aufreinigung mittels MACS-Technologie**

Die Magnetic Activated Cell Sorter (MACS)-Technologie ermöglicht die Isolation einer bestimmten Zellpopulation aufgrund der Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen. Dafür werden Antikörper verwendet, die an Magnetpartikel gekoppelt sind. Die Separation kann entweder direkt, durch das Markieren der gewünschten Zellpopulation, oder indirekt, durch die Markierung aller anderen Zellen, erfolgen. Dafür wurden die entsprechenden MACS Säulen verwendet, welche in einen starken Magneten platziert wurden. Die Zellsuspension wurde auf die Säulen gegeben und anschließend wurden die Säulen mit MACS Puffer gespült. Der Durchfluss wurde aufgefangen, welcher die unmarkierten Zellen enthält. Durch Entnahme der Säule aus dem Magneten, konnte durch erneutes Spülen die Fraktion mit den markierten Zellen gewonnen werden.

Die Depletion von B220<sup>+</sup> Zellen aus der Milz erfolgte mit dem CD45R (B220) Micro Beads Kit (Miltenyi) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Isolierte Milzzellen wurden mit den B220 Magnetpartikel (Klon RA3-6B2, 10 µl / 10<sup>7</sup> Zellen) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend gewaschen. Die Zellen wurden in MACS-Puffer aufgenommen und auf eine LD-Säule gegeben. Der Durchfluss mit aufgereinigten T-Zellen wurde aufgefangen und weiterverwendet, während die gebundenen B220<sup>+</sup> Zellen verworfen wurden.

Die Isolation von T-Zellen erfolgte durch negative Selektion mit dem PanT Isolation Kit, welches aus einem Mix aus mehreren Biotin- Antikörpern besteht: CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, anti-MHC class II und Ter-119 (10 µl/ 10<sup>7</sup> Zellen). Die Inkubation erfolgte für 5 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden anti-Biotin MicroBeads (20 µl/ 10<sup>7</sup> Zellen) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, in MACS-Puffer aufgenommen und auf eine LS-Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die Reinheit mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die Reinheit lag bei etwa 90 % T-Zellen.

### 3.2.3.3 Zell-Markierung mit CellTracker

Um eine bestimmte Zellpopulation nach *in vivo* Applikation wieder aufzufinden, empfiehlt sich die Markierung der Zellen mit einem CellTracker. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der ohne deren Funktion zu beeinträchtigen durch die Zellmembran die Zelle passiert, wo er in zellimpermeable Reaktionsprodukte umgewandelt wird. Die T-Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert, in serumfreien RPMI Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Maximal  $1 \times 10^8$  Milzzellen wurden zentrifugiert und in 10 ml vorgewärmten RPMI mit 1  $\mu$ M CellTracker™ Deep Red Dye für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und in PBS aufgenommen, um die Zellzahl zu bestimmen. Danach konnten sie für Versuche verwendet werden.

### 3.2.4 Generierung und Stimulation von murinen DCs

Um murine DCs *in vitro* zu generieren wurde Knochenmark wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben isoliert. Davon wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Zellkulturmedium V (siehe Tabelle 2.7) mit 100 U/ml GM-CSF in einer Petrischale ausgesät und bei 37°C kultiviert. Nach drei Tagen wurden weitere 10 ml Medium mit 100 U/ml GM-CSF hinzugeben und die Zellen weitere drei Tage kultiviert. Nach diesem Zeitraum von insgesamt sechs Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem die Hälfte des Mediums ausgetauscht wurde. Dafür wurden 10 ml des Mediums abgenommen und zentrifugiert, um keine Zellen zu verlieren. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und zu den verbleibenden Zellen gegeben. GM-CSF wurde entsprechend der gewünschten Endkonzentration von 50 U/ml hinzugegeben. Zwei Tage später wurden die bmDCs für Experimente verwendet. Dafür wurde das Medium abgenommen und die verbleibenden Zellen für etwa 30 Minuten bei 37°C mit Accutase® abgelöst. Anschließend wurden diese Zellen zu dem Medium gegeben und zentrifugiert. Die bmDCs wurden in Medium aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden sie entweder mit PBS gewaschen und für *in vivo* Versuche verwendet oder für *in vitro* Versuche weiter kultiviert. In dem Fall wurden  $0,15 \times 10^6$  bmDCs in 200  $\mu$ l Zellkulturmedium V in 96-Well-Rundbodenplatten gegeben und mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  für 6 Stunden bei 37°C vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Stimulation von je zwei Wells (Dubletten) mit verschiedenen TLR-Liganden (Pam3, Pst1, LPS und Sa19). Sa19 wurde zuvor für 10 min bei Raumtemperatur in 10  $\mu$ l LyoVec inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen, die Dubletten gepoolt und für ELISA-Messungen bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden mit Accutase® abgelöst und durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.2.5 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wird verwendet, um Zellen oder Partikel zu charakterisieren. Das Gerät erzeugt einen sehr feinen Hüllstrom, in dem einzelne Zellen von den Lasern angeregt werden können. Zwei Detektoren geben Aufschluss über die Beschaffenheit der Zellen, von denen sich einer auf einer Ebene mit dem Laserstrahl befindet (forward scatter, FSC) und der andere vertikal dazu (sidewards scatter, SSC). Während der FSC die Größe der Zelle detektiert, liefert der SSC aufgrund der Streuung des Lichtes Erkenntnisse über die Granularität der Zellen. Zusätzlich können durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gezielt Proteine auf und in den Zellen markiert werden. Werden diese von dem entsprechenden Laser angeregt, wird das emittierte Licht von den Detektoren erfasst. Für die Analyse der Färbungen wurde der BD FACS Canto II mit drei Lasern (488, 633 und 405) und die FACS Diva 8 Software verwendet.

#### **3.2.5.1 Oberflächenfärbung**

Für die Färbungen von Oberflächenmolekülen wurden Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern verwendet und die Färbung in 96-Well-Rundbodenplatten durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit den primären Antikörpern inkubiert, die in PBS mit 3 % Mausserum und 10 % FCS verdünnt wurden. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei 4°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und tote Zellen wurden mit ViabilityDyes in PBS für 20 Minuten bei 4°C gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in Azid-PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

#### **3.2.5.2 Intrazelluläre Färbung**

Zur Detektion von intrazellulären Proteinen, wie IFN- $\gamma$ , erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit Cytofix/Cytoperm für 20 Minuten bei 4°C. Die Zellen wurden einmal mit Perm/Wash gewaschen und anschließend mit dem Antikörper in Perm/Wash für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen in Stainingbuffer resuspendiert und innerhalb der nächsten Stunde mit dem Durchflusszytometer analysiert.

#### **3.2.5.3 Detektion von Apoptose**

Zur durchflusszytometrischen Detektion toter Zellen wurde das Annexin-V Apoptosis Detection Kit von BD Bioscience verwendet. Annexin-V bindet Phosphatidyl-Reste, die während der Apoptose von der zytosolischen Zellmembran nach außen transloziert werden, ohne dass die Membranintegrität beeinflusst wird. Bei fortgeschrittener Apoptose oder

anderen Formen des Zelltods, wie Nekrose, bilden sich Poren in der Membran, sodass 7-Aminoactinomycin (7-AAD) in die Zelle eindringen und im Zellkern in die DNA interkalieren kann. Dort emittiert es rotes Licht, sodass die Zellen doppelt-positiv erscheinen. Die Zellen wurden in 50 µl Annexin Binding Buffer mit Annexin-V (1:100) und 7-AAD (1:100) resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 150 µl des Puffers hinzugeben und die Zellen direkt im Durchflusszytometer gemessen.

### 3.2.6 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur Quantifizierung von Proteinen, die sich in Lösung befinden. Er wurde verwendet, um Zytokine im Serum von Mäusen und in Überständen von *ex vivo* kultivierten Tumoren zu messen. Da sich bei der Methode das untersuchte Antigen zwischen zwei Antikörpern befindet, bezeichnet man sie als Sandwich-Immunoassay. Eine 96-Well Mikrotiterplatte wurde mit dem ersten Antikörper (Fang-Antikörper) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Antikörperlösung wurde entfernt und unspezifische Bindungen durch Inkubation mit Blockierungspuffer (R&D) oder Assay Diluent (BD) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Platten direkt verwendet oder bei 4°C für spätere Messungen aufbewahrt. Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen und 50 µl der Proben, pur oder in Reagent Diluent (R&D) bzw. Assay Diluent (BD) vorverdünnt, in Triplets aufgetragen. Um die Konzentration bestimmen zu können, wurde auf jede Platte eine Standardverdünnung aufgetragen. Nach einer Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur, wurden alle ungebundenen Proteine mit Waschpuffer entfernt und der zweite Antikörper (Detektionsantikörper) wurde hinzugegeben. Bei BD ELISA ist dieser Biotin-gekoppelte Detektionsantikörper bereits an HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppeltes Streptavidin gebunden. Die Inkubation erfolgt in diesem Fall für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Bei den R&D Kits, wird der Biotin-gekoppelte Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und nach einem Waschschrift mit HRP- gekoppeltes Streptavidin für 45 Minuten hinzugegeben. Um die Menge an Protein zu detektieren, wurde nach einem weiteren Waschschrift 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Die Peroxidase spaltet  $H_2O_2$  in OH-Radikale, welche dem TMB ein Elektron entzieht. Das TMB-Radikalkation besitzt eine blaue Farbe. Nach 15 bis 30 Minuten wurde durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure die Reaktion gestoppt, wodurch das Enzym denaturiert und es zu einem



Farbumschlag von blau nach gelb kommt. Die kolorimetrische Detektion und Analyse erfolgte bei 450 nm im Multi-Detektion-Reader Synergy 2 und der Software Gen5 1.06.

### **3.3 Histologie**

#### **3.3.1 Pathomorphologische Tumoranalyse**

Die Tumore wurden entweder mit oder ohne Haut präpariert und in Tissue-Tek® eingebettet. So schnell wie möglich wurde das eingebettete Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Mit einem Mikrotom wurden bei -22 bis -25°C 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die über Nacht getrocknet und dann bei -80°C gelagert wurden. Mittels Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Färbung wurde das Gewebe hinsichtlich seiner Morphologie untersucht. Während das Hämatoxylin alle sauren Strukturen wie Nukleinsäuren blau färbt, lässt Eosin alle basischen Strukturen rot erscheinen, wodurch z.B. die im Zytoplasma befindlichen Proteine angefärbt werden. Für die Färbung wurden die Gewebsschnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, dann in gefiltertem Hämatoxylin für 30 Sekunden gefärbt und für 10 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Die Färbung in gefiltertem 0,5-prozentigen Eosin erfolgte für 3 Minuten. Nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Gewebsschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert. Nach einer 10-minütigen Inkubation in Xylol, wurden die Schnitte mit Roti® Histokitt eingedeckt.

#### **3.3.2 Immunhistochemie**

Für die Detektion spezifischer Proteine wurde eine kolorimetrische Färbung mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte nach dem Auftauen mit dem Cytofix/Cytoperm Kit für 30 Minuten fixiert. Um endogene Peroxidasen zu blockieren und somit die Hintergrundfärbung zu reduzieren, erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Der Primärantikörper wurde in Permeabilisierungspuffer (Perm Wash) verdünnt und die Präparate damit entweder über Nacht bei 4°C oder für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Zwischen den Schritten erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS (pH 7,3). Die sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper wurden in TBS (pH 7,2-7,4) mit 10 % FCS und 20 % Mausserum verdünnt und die Gewebeschnitte jeweils für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Aminoethylcabazol (AEC)-Lösung für 10 Minuten auf die Präparate gegeben, wodurch eine Farbreaktion mit der gekoppelten

Peroxidase ablief und die gebundenen Antikörper sichtbar wurden. Zwischen diesen Schritten erfolgte dreimaliges Waschen mit TBS. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, folgten nun ein Waschschriff mit destilliertem Wasser und eine kurze Kernfärbung mit Hämalaun-Lösung, je nach gewünschter Farbintensität für 5 bis 15 Sekunden. Nach 10-minütigen Bläuen mit Leitungswasser, konnten die Gewebeschnitte in warmer Kaiser-Glycerin-Gelatine eingedeckt werden.

### 3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Gewebeschnitte wurden mit Cytofix/Cytoperm oder Aceton fixiert und mit PBS gewaschen (siehe Tabelle 3.1). Die primären Antikörper wurden in Perm Wash oder in PBS mit 2 % FCS verdünnt und die Präparate in einer feuchten Kammer für 45 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte, falls erforderlich, die Inkubation der Schnitte mit immunfluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpern in PBS mit 5 % BSA beziehungsweise PBS mit 2 % FCS für 30 bis 45 Minuten. Um die Zellkerne zu färben wurde DAPI (1:36000) hinzugegeben. Bereits fluoreszenzgekoppelten primäre Antikörper wurden in diesem Schritt nur mit DAPI inkubiert. Anschließend wurden die Präparate wieder gewaschen und mit Fluoprep eingedeckt. Die Färbung wurde zeitnah am Mikroskop analysiert und fotografiert (siehe Kapitel 3.3.5). Die Objektträger wurden bei 4°C gelagert. Die Doppelfärbungen mit CD31 und den Perizytenmarkern Desmin, PDGFR-β und α-SMA (*alpha-smooth muscle actin*) wurden in Kooperation von PD Dr. Iris Helfrich in der Dermatologie der Universitätsklinik Essen durchgeführt (Helfrich *et al.*, 2010).

**Tab. 3.1:** Färbeprotokolle für die Immunfluoreszenzfärbung

Antigen	Fixierung	Dauer (min)	prim.AK	Dauer (min)	sek.AK/Dapi
<b>aktive Caspase 3</b>	Cytofix/Cytoperm	20	Perm/Wash	120	1xPBS + 5 % BSA
<b>CD31</b>	Cytofix/Cytoperm	30	Perm/Wash	45	1xPBS + 5 % BSA
<b>Granzyme B</b>	Cytofix/Cytoperm	30	Perm/Wash	45	1xPBS + 5 % BSA
<b>CD45-FITC</b>	Cytofix/Cytoperm	30	Perm/Wash	45	1xPBS + 5 % BSA
<b>CD11c-PE</b>	Aceton	10	1xPBS + 2 % FCS	45	1xPBS + 2 % FCS
<b>CD209a-eFluor 660</b>	Aceton	10	1xPBS + 2 % FCS	45	1xPBS + 2 % FCS

### 3.3.4 Apoptosefärbung mit der TUNEL Färbung

Um apoptotische Zellen im Tumorgewebe zu quantifizieren wurde das APO-DIRECT™ TUNEL Kit verwendet. Es detektiert DNA-Fragmente, die bei der Apoptose entstehen. Getrocknete Gefrierschnitte wurden mit 3 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit 70 % Ethanol für 15 Minuten fixiert. Die Gewebeschnitte wurden dreimal für 5 Minuten mit dem Waschpuffer des Kits inkubiert. Die Färbelösung wurde nach den Angaben der Hersteller angesetzt und die Proben damit für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer im Dunklen inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem Rinse Buffer für 5 Minuten. Anschließend wurden die Kerne für 20 Minuten mit 7-AAD (1:50) in Rinse Buffer im Dunklen gefärbt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit Fluoprep eingedeckt.

### 3.3.5 Quantifizierung der histologischen Färbungen

Für die Licht- und Fluoreszenzmikroskopie wurde das Axioskop 2 und die AxioVision Software verwendet. Die Bilder wurden bei einer 25- bis 400-fachen Vergrößerung mit einer AxioCam MRc 5 Kamera aufgenommen. Immunhistochemische Färbungen wurden bei einer 200-fachen Vergrößerung vier repräsentative Bereiche der Tumore fotografiert und per Hand ausgezählt. Doppelfärbungen wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Die TUNEL-Färbung wurde quantifiziert, indem von jedem Tumor bei 25-facher Vergrößerung ein Foto mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen wurde. Anschließend wurde mittels ImageJ die Anzahl positiver Zellen ermittelt, wobei immer der gleiche *Threshold* verwendet wurde.

## 3.4 Tumor-Clearing

Das „Clearen“ von Geweben ist eine neue Methode, um ein ganzes Organ oder einen Tumor mikroskopisch zu untersuchen. Hier wurde das 3DISCO Protokoll in leicht modifizierter Form verwendet, welches 2012 von A. Ertürk und Kollegen entwickelt wurde (Ertürk *et al.*, 2012).

### 3.4.1 Tumor-Clearing und Ultramikroskop

Die Gefäßfärbung erfolgte mit einem fluoreszenzgekoppeltem Alexa Fluor 647 anti-CD31 Antikörper. Die tumortragenden Mäuse (Tag 10 nach Injektion) wurden narkotisiert und 10 µg Antikörper in 150 µl PBS retrobulbär injiziert. Nach 20 Minuten wurden das Tier mit Isofluran getötet und so schnell wie möglich perfundiert. Dafür wurde das Herz freigelegt

und der linke Ventrikel mit einem Butterfly punktiert. Das rechte Atrium wurde vorsichtig aufgeschnitten und über den Butterfly wurde langsam 15 bis 20 ml EDTA injiziert. Anschließend erfolgte die Injektion von 15 bis 20 ml 4 % PFA. Eine erfolgreiche Perfusion konnte über das Aufhellen der Leber überprüft werden. Der Tumor wurde präpariert und in ein kleines Glasgefäß mit 4 % PFA überführt, worin er für 20 Minuten fixiert wurde. Diese und alle folgenden Inkubationen erfolgten unter regelmäßiger Bewegung im Dunklen bei 4°C. Es folgten jeweils 30-minütige Inkubationsschritte in einer aufsteigenden Tetrahydrofuran (THF)-Reihe (30 %, 50 %, 80 % und zweimal 100 %). Abschließend wurde der Tumor in Dibenzylether (DBE) für mindestens 30 Minuten inkubiert, wodurch die vollständige Transparenz des Gewebes erzielt wurde. Die Tumore wurden in DBE bis zum folgenden Tag bei 4°C gelagert und am La Vision BioTec Ultramikroskop mit der Light-Sheet Technologie untersucht.

Dafür wurden die Tumore in eine kleine Halterung eingespannt und in die Kammer des Ultramikroskops positioniert, welche mit DBE gefüllt wurde. Die vorgenommenen Laser- und Filtereinstellung können Tabelle 3.2 entnommen werden. Die Breite der Lichtblätter wurde für die Probe optimiert und kann bei kleinen Objekten verringert werden. Beide Lichtblätter wurden kalibriert, sodass das Objekt optimal beleuchtet wurde. Die Aufnahme erfolgte mit der *Multi Color 3D* Messung mit einer 4- bis 5-fachen Vergrößerung. Aus den Rohdaten wurden mit der ImageJ Software die einzelnen Farbkanäle extrahiert und ein *Composite* erstellt, welches in die Imaris Software eingespeist wurde, um dort die 3D-Darstellung vorzunehmen.

**Tab. 3.2:** Laser- und Filtereinstellung des Lightsheet-Mikroskops

Laser	Filter	Signal
488	525/50	GFP
647	680/30	Deep Red/CD31
561	585/40	Autofluoreszenz

### 3.4.2 Adoptiver Zelltransfer

Die WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse wurden 6 Tage zuvor mit 1x10<sup>6</sup> MOPC <sup>-eGFP</sup> Tumorzellen s.c. an drei verschiedenen Stellen auf dem Rücken injiziert, um sicherzustellen, dass mindestens ein Tumor pro Maus zu solch einem frühen Zeitpunkt gefunden werden konnte. Die Spendermäuse wurden bereits 10 Tage im Voraus mit 1x10<sup>6</sup> MOPC <sup>-eGFP</sup> Tumorzellen s.c.

injiziert, um eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems sicher zu stellen. Die Milzen der Spendermäuse wurden entnommen, die Zellen isoliert und mit dem CellTracker™ Deep Red markiert (siehe Kapitel 3.2.3.3).  $1 \times 10^7$  markierte Zellen wurden i.v. in die Empfängermause injiziert. Ein Tag später wurden die Tumore chemisch gecleart (siehe vorheriges Kapitel), ohne jedoch die Gefäße zu färben. Nach der generellen Aufarbeitung der Rohdaten mit ImageJ und Imaris, wurde die Darstellung der infiltrierenden Immunzellen in den Tumor mit der Imaris Software durch folgende Anwendungen optimiert: erst *Smoothing*, um die Flächen abzurunden, dann wurde der *Gaussian Filter* mit  $1,3 \mu\text{m}$  angewendet. Es folgte die *Background subtraction* von  $6 \mu\text{m}$ , um den Hintergrund in dem roten Kanal zu entfernen ( $6 \mu\text{m}$  entsprechen der Abmessung der größten Immunzellen in den Aufnahmen) und schließlich *Channel Arithmetics*, um die Autofluoreszenz von den Tumorzellen zu entfernen.

### 3.5 Molekularbiologie

#### 3.5.1 Isolation von RNA und Reverse Transkription

Die Tumore wurden direkt nach der Präparation in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Tumorgewebe wurde im gefrorenen Zustand mechanisch mit einem Stößel zerkleinert und die RNA nach Herstellerangaben mit dem RNeasy® Mini Kit isoliert. Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurde mit einem BioPhotometer überprüft. Sofort danach erfolgte die Umschrift von 50 ng oder 100 ng RNA mittels SuperScript™ II RT Kit nach Herstellerangaben. Die entstandene cDNA wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.5.2 Quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktion

Die qualitative Real Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde mit der umgeschriebenen cDNA durchgeführt. Dafür wurde das Maxima™ SYBR™ Green Kit und je  $0,5 \mu\text{M}$  der entsprechenden Primer verwendet (siehe Tabelle 2.11). Für jede Probe wurde  $\beta$ -Aktin als *Housekeeping Gene* mit bestimmt. Die Amplifikation wurde mit dem LightCycler® durchgeführt und mit der LightCycler 3 Software analysiert.

#### 3.5.3 cDNA Mikroarray Analyse

Tumore von WT und TLR3/7/9-defizienten Mäusen wurde nach 4 bzw. 6 Tagen präpariert und die RNA isoliert (siehe vorheriges Kapitel). Die RNA wurde an das Institut für Zellbiologie (Universität Duisburg-Essen) übergeben, wo die Proben in cDNA

umgeschrieben wurden und mit jeweils einem Affymetrix Chip MG-430\_2.0 hinsichtlich der Regulation von über 45.000 Genen analysiert wurden.

### **3.6 Statistik**

Die statistische Analyse wurde mit EXCEL oder der GraphPad Prism Software durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für den Vergleich von zwei Gruppen mit dem Student's T-test ermittelt und für mehr als zwei Gruppen mit der einfaktoriellen ANOVA mit dem Bonferroni post hoc Test. Die Ergebnisse wurden ab einem Wert von  $p \leq 0.05$  (\*) als signifikant bewertet, stärkere statistische Unterschiede wurden mit  $p \leq 0.05$  (\*\*) oder  $p \leq 0.005$  (\*\*\*) markiert.

## 4 Ergebnisse

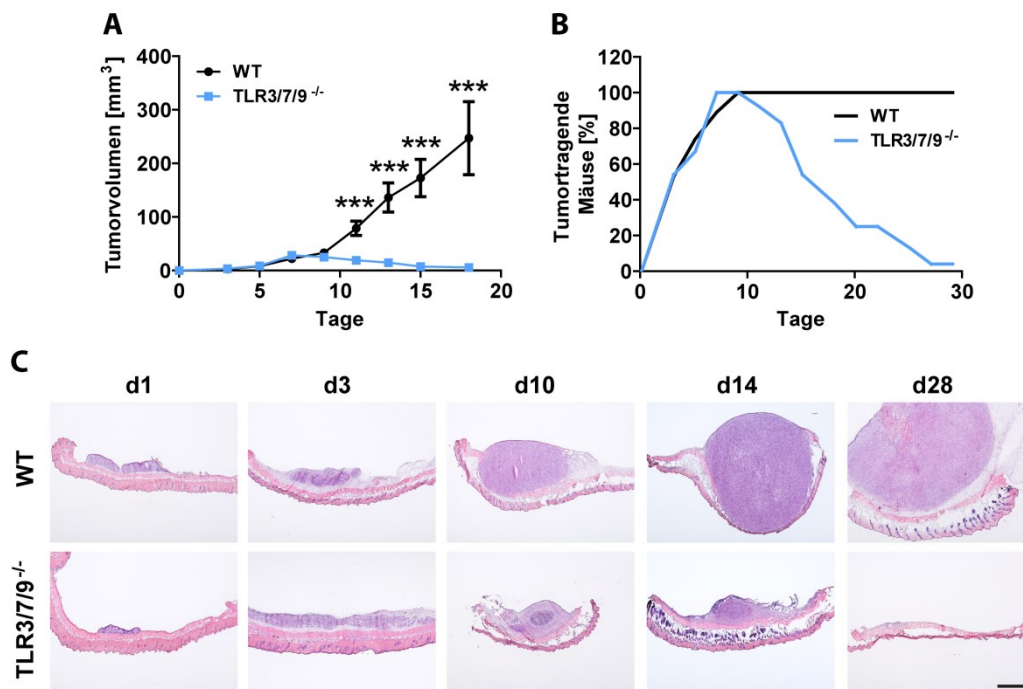
### 4.1 Der Einfluss von endosomalen Toll-like Rezeptoren auf das Tumorwachstum

Die Rolle endosomaler TLRs in der Onkologie wird kontrovers diskutiert. Während sich die Immuntherapie auf der Basis von TLR7-Liganden bereits in der Klinik bewährt hat, zeigen viele Studien mit anderen TLR-Liganden nur geringe therapeutische Effekte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass nicht nur Immunzellen TLRs exprimieren, sondern diese auch auf Tumorzellen und nicht-hämatopoetischen Kompartimenten des Tumorstromas vorhanden sind. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von endosomalen TLRs einen tumorfördernden Effekt haben kann (Chuang *et al.*, 2012; Ilvesaro *et al.*, 2007). Bisher wurde die Rolle der endosomalen TLRs hauptsächlich durch die Stimulation der Rezeptoren durch bakterielle oder virale PAMPs untersucht. Bei der Entstehung von Tumoren werden jedoch auch körpereigene (endogene) TLR-Liganden, wie Nukleinsäuren, freigesetzt. Mit Hilfe eines dreifach-defizienten TLR3/7/9-Mausstammes soll im Folgenden die Rolle endogener TLR-Liganden auf das Tumorwachstum untersucht werden.

#### 4.1.1 Tumorabstoßung durch fehlende Toll-like Rezeptoren

Um den Einfluss endosomaler TLRs zu untersuchen, wurde die murine Kopf-Hals-Tumorzelllinie MOPC<sup>-</sup> in WT und TLR3/7/9-defiziente Mäuse subkutan injiziert. In den ersten Tagen nach der Injektion zeigten sich keine Unterschiede im Wachstum der Tumore und alle Mäuse entwickelten einen messbaren Tumor. Überraschenderweise verringerte sich das Volumen der Tumore in den TLR-defizienten Mäusen nach etwa einer Woche und innerhalb der nächsten zwei Wochen kam es zur vollständigen Abstoßung der Tumore (Abb. 4.1 A, B). Um die Morphologie genauer zu untersuchen, wurden die Tumore zu verschiedenen Zeitpunkten der Entstehung und Abstoßung zusammen mit der umliegenden Haut entnommen und mittels HE Färbung untersucht. Die Analyse bestätigte, dass bereits zehn Tage nach der Injektion deutliche Unterschiede in der Größe auftraten und dass nach 28 Tagen in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen keine Tumorzellen mehr zu finden waren (Abb. 4.1 C). Dass die Tumore aufgrund einer Alloreaktivität durch einen verbleibenden 129/SV-Hintergrund abgestoßen wurden, kann ausgeschlossen werden. Die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch die Verpaarung von TLR-Einzel-Knockout Mäusen gezüchtet, die in 129/SV

Mäusen generiert und mindestens 7-fach zurück gekreuzt wurden (Yu *et al.*, 2012b). Zudem hatten alle WT Mäuse der F1-Generation aus 129/SV und BL/6 Mäusen Tumore entwickelt, die sogar ein schnelleres Wachstum als in der C57BL/6-Kontrolle zeigten, während die reinen 129/SV Mäuse aufgrund der erwarteten Alloreaktivität keinen Tumor entwickelten (Klein, 2012).

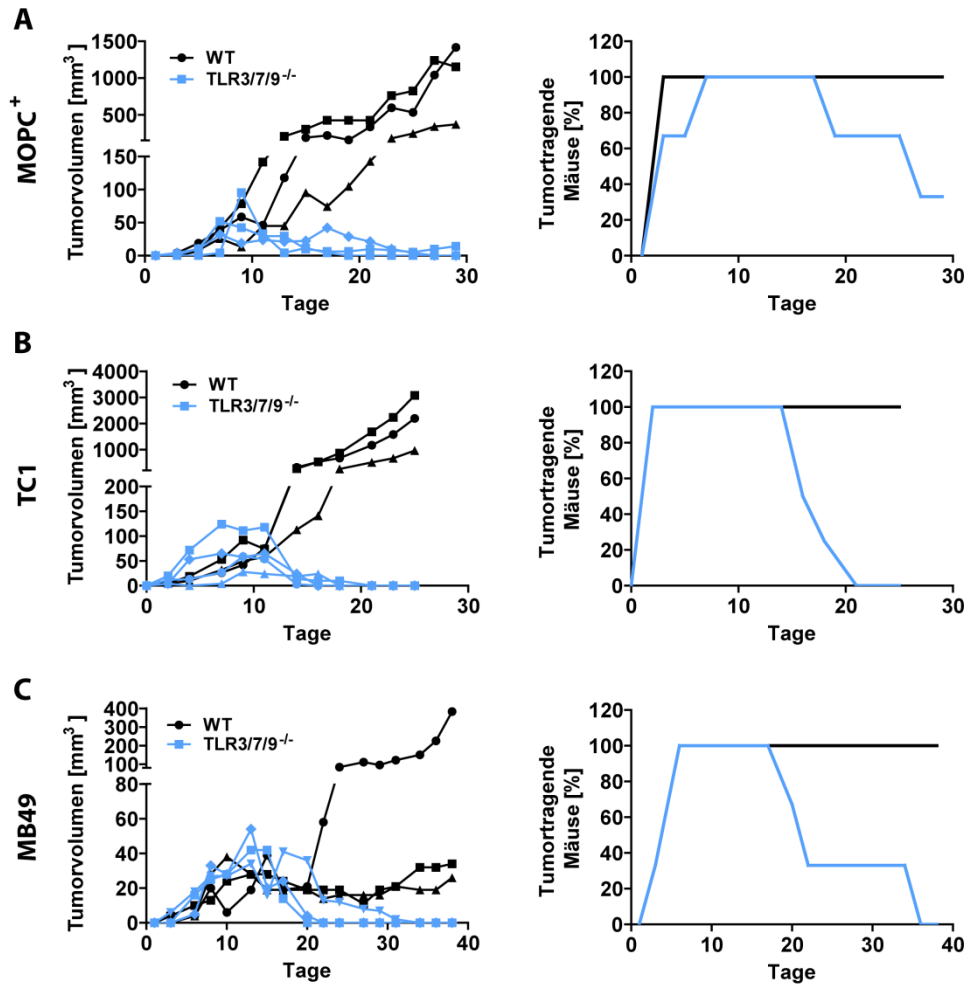


**Abb. 4.1: Abstoßung von MOPC Tumoren in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) Tumorwachstum in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.  $5 \times 10^5$  MOPC<sup>+</sup> Zellen wurden s.c. in WT (n=19) und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse (n=24) injiziert, das Tumolvolumen alle 2-3 Tage ausgemessen und der Mittelwert  $\pm$ SEM aufgetragen. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  erreicht (Student's t-Test). Zudem wurde der prozentuale Anteil an tumortragenden Mäusen bestimmt (B). (C) Histologische Analyse in Zeitverlauf.  $1 \times 10^6$  MOPC<sup>+</sup> Zellen wurden s.c. in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, Tag 3, Tag 10, Tag 14 und Tag 28) entnommen. Von den Proben (Tumore inkl. Haut) wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese mit H&E gefärbt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel. Der Maßstabsbalken entspricht 1000 µm.

Um auszuschließen, dass diese Abstoßungsreaktion ein zelllinienspezifischer Effekt ist, wurde das subkutane Tumorwachstum von drei weiteren Zelllinien untersucht. Die Anzahl der injizierten Tumorzellen wurden in Vorversuchen in WT Mäusen titriert und anschließend in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen. Durch die Verwendung der MOPC<sup>+</sup> Zellen, die Plasmide enthalten, welche für die HPV E6/E7 Gene kodieren, konnte der Einfluss von HPV-Antigenen auf das Tumorwachstum ausgeschlossen werden, da es auch in diesem Fall zur Abstoßung der Tumore in den TLR-defizienten Mäusen kam (Abb. 4.2 A). Auch die Injektion der Lungenkarzinomzelllinie TC1 und einer Blasenkarzinomzelllinie

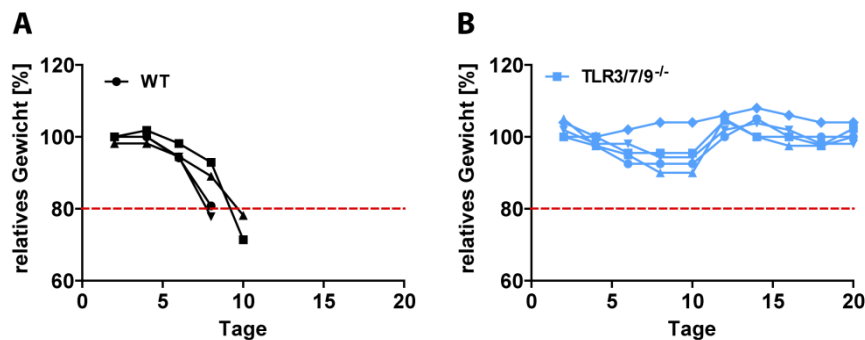


MB49, führte zur anfänglichen Entwicklung eines Tumors, der jedoch nach etwa zwei bis vier Wochen ebenfalls in allen TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen abgestoßen wurde (Abb. 4.2 B, C).



**Abb. 4.2: TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse stoßen weitere Tumorzelllinien ab.** (A)  $5 \times 10^5$  MOPC<sup>+</sup> Zellen, (B)  $2 \times 10^6$  TC1-Zellen und (C)  $5 \times 10^5$  MB49 Zellen wurden s.c. in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse s.c. injiziert (n=3-4). Das Tumorstadium wurde alle 2-3 Tage bestimmt und der prozentuale Anteil an tumortragenden Mäusen bestimmt.

Um herauszufinden, ob das veränderte Tumorwachstum auf Besonderheiten in der Mikroumgebung der Haut zurückzuführen ist, wurde das Wachstum der MOPC<sup>-</sup> Zellen im orthotopen Modell untersucht. Dafür wurden die Zellen in den Mundboden der Mäuse injiziert und das Gewicht der Mäuse aufgezeichnet. Entwickelt sich ein Tumor in dem Mundbereich, so sind die Tiere in ihrer Nahrungsaufnahme beeinträchtigt und verlieren an Gewicht. In WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen trat in den ersten Tagen nach der Tumordinjektion ein Gewichtsverlust ein, aber nur die WT Mäuse erreichten innerhalb von zehn Tagen das erlaubte Maximum von 20 % Verlust zum Ausgangsgewicht (Abb. 4.3 A). Die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse nahmen zu diesem Zeitpunkt wieder an Gewicht zu, sodass sie zwölf Tage nach der Injektion ihr Ausgangsgewicht erreichten (Abb. 4.3 B). Dies entspricht der Abstoßungsphase im subkutanen Modell und zeigt, dass es sich nicht um einen lokalen Mechanismus, sondern vielmehr um einen generellen anti-tumoralen Effekt in den TLR-defizienten Mäusen handelt.

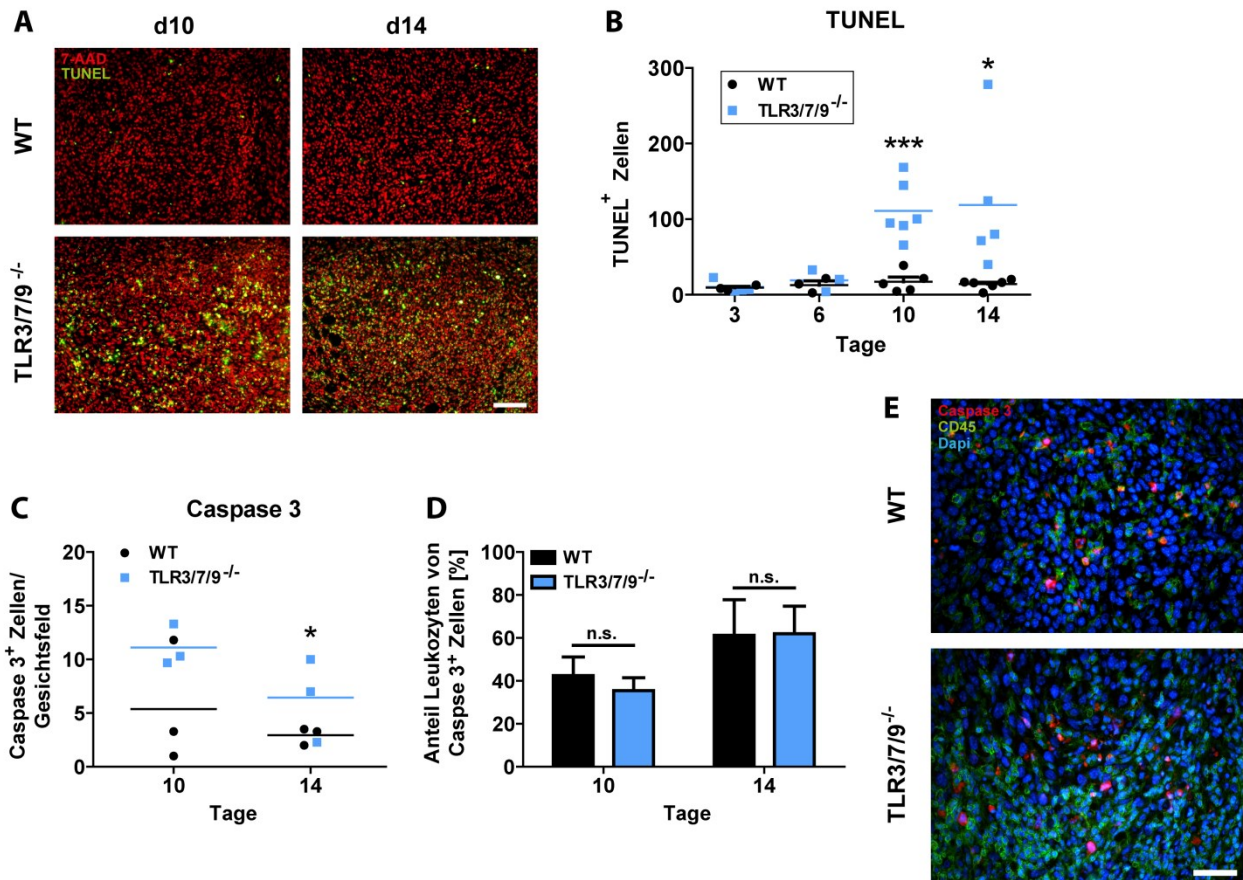


**Abb. 4.3: Orthotopes Wachstum der MOPC Tumore in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.**  $5 \times 10^5$  MOPC<sup>-</sup> Zellen wurden orthotop in den Mundboden von (A) WT Mäusen (n=4) und (B) TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (n=5) injiziert. Das Gewicht wurde in Prozent zu dem Startgewicht aufgetragen. Bei einer Gewichtsreduktion von 20% des Startgewichts (rote Linie) mussten die Tiere aus dem Versuch genommen werden.

## 4.1.2 Erhöhter Zelltod in Tumoren aus TLR-defizienten Mäusen

Um zu verifizieren, ob die Rückbildung der Tumore durch die Induktion von Zelltod hervorgerufen wird, wurden sterbende Zellen im Tumor mittels TUNEL-Färbung visualisiert (Abb. 4.4 A). Während in der frühen Phase der Tumorentstehung noch keine Unterschiede zu finden waren, zeigte sich in der Phase der Tumorabstoßung eine deutliche Zunahme der TUNEL positiven Zellen in den Tumoren der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse (Abb. 4.4 B). Um die sterbenden Zellen genauer zu untersuchen, wurde die Anzahl Caspase 3<sup>+</sup> Zellen bestimmt (Abb. 4.4 C). Auch hier zeigte sich eine erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Tumoren der TLR-defizienten Mäuse, jedoch fiel der Unterschied geringer aus. Dies lässt auf einen großen

Anteil an nekrotischen Zellen in Tumor der TLR-defizienten Mäuse schließen, die von der TUNEL-Färbung mit erfasst werden, jedoch nicht positiv für Caspase 3 sind.



**Abb. 4.4: Erhöhter Zelltod in Tumoren aus TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) TUNEL-Färbung von Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 10 und Tag 14. Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel. TUNEL<sup>+</sup> Zellen sind grün und die Zellkerne wurden mit 7-AAD (rot) angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Die Anzahl von TUNEL<sup>+</sup> Zellen im gesamten Tumor. Die Quantifizierung fand bei Tumoren an Tag 3, Tag 6, Tag 10 und Tag 14 statt (n=3-6). (C) Quantifizierung von Caspase 3<sup>+</sup> Zellen in Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 10 und Tag 14. Ausgezählt wurden vier Gesichtsfelder aus repräsentativen Bereichen bei 200-facher Vergrößerung (n=3). (D) Quantifizierung von Caspase 3<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen bei 400-facher Vergrößerung. Dargestellt wurde der Mittelwert + SEM von CD45<sup>+</sup> Zellen (Leukozyten) in Prozent zu den Caspase 3<sup>+</sup> Zellen (n=3). Statistische Signifikanz wurde mit p<0,05 erreicht (Student's t-Test). (E) Repräsentatives Beispiel der Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Caspase 3 (rot), anti-CD45 (grün) und Dapi (blau) von Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 10 und Tag 14 bei 400-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

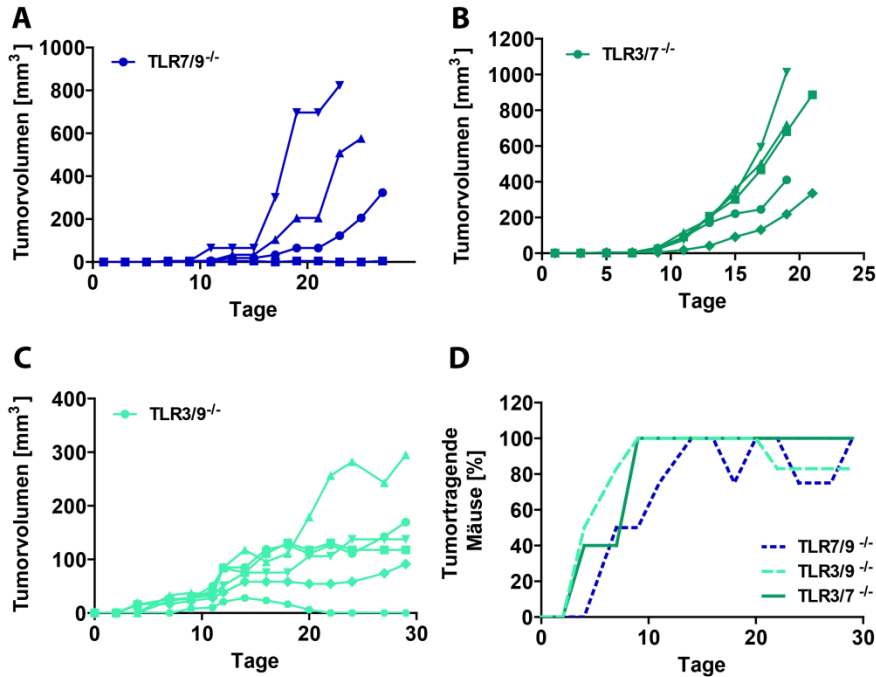
Um zu quantifizieren, ob vor allem Tumorzellen oder infiltrierende Immunzellen sterben, wurde eine Doppelfärbung von Caspase 3 und dem Leukozytenmarker CD45 durchgeführt (Abb. 4.4 E). Es zeigte sich, dass die Anzahl sterbender Immunzellen in den Tumoren von WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen von Tag 10 zu Tag 14 zunahm, es jedoch keine Unterschiede in dem prozentualen Anteil von Leukozyten zwischen beiden Mäusstämmen gab (Abb. 4.4 D).

Daraus lässt sich schließen, dass der Anteil apoptotischer Immunzellen keinen Einfluss auf die Entwicklung des Tumors hat.

### **4.1.3 Welcher TLR-Signalweg ist für die Tumorabstoßung verantwortlich?**

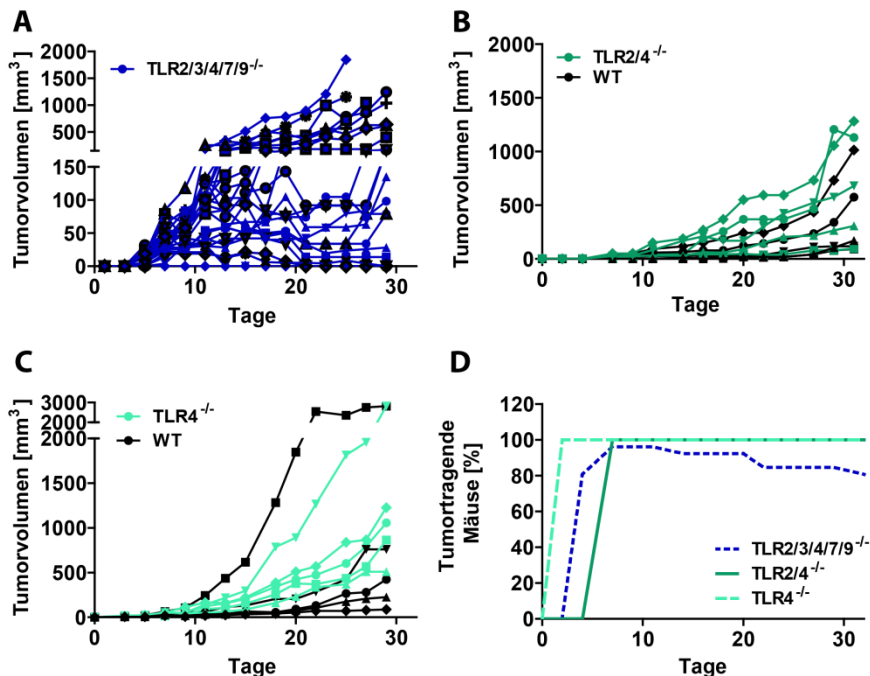
Da bisher alle Versuche in TLR3/7/9-Dreifach-Knockout (KO) Mäusen durchgeführt wurden, stellt sich die Frage, ob das Fehlen von nur einem oder zwei der TLRs den beobachteten Phänotyp hervorrufen kann. In vorherigen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die TLR3-, TLR7- und TLR9-Einzel-KO Mäuse die Tumorzellen nicht abstoßen konnten, jedoch entwickelte eine von vier TLR3-KO Mäusen überhaupt keinen Tumor (Klein, 2012). Sowohl die TLR7/9<sup>-/-</sup> Mäuse (Klein, 2012), als auch die Kombination von TLR3 und TLR7 (TLR3/7<sup>-/-</sup>) bzw. TLR3 und TLR9 (TLR3/9<sup>-/-</sup>) führte innerhalb von zwei Wochen zur Ausbildung solider Tumore (Abb. 4.5 A-C). Allerdings gab es unter den TLR7/9<sup>-/-</sup> und TLR3/9<sup>-/-</sup> Mäusen jeweils ein Tier, dass den Tumor ganz oder fast abstoßen konnte (Abb. 4.5 D). Dennoch macht dieses Ergebnis deutlich, dass für eine effektive Tumorabstoßung alle drei TLRs fehlen müssen.

Pro-tumorale Effekte von TLRs sind vor allem für TLR2 und TLR4 beschrieben. Durch die Verwendung eines TLR2/3/4/7/9-defizienten Stamm (5-fach KO), wollten wir untersuchen, wie sich das zusätzliche Fehlen von TLR2 und TLR4 auf die Abstoßung der Tumore auswirkt. Überraschenderweise zeigte sich, dass etwa die Hälfte der Mäuse einen großen Tumor entwickelten, während die Tumore in den anderen Mäusen nur sehr langsam wuchsen und in ca. 20 % der Tiere der Tumor abgestoßen wurde (Abb. 4.6 A, D). Um diesen Phänotyp verstehen zu können, wurde anschließend das Tumorstadium in TLR2/4<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass diese Mäuse wie in der WT-Situation einen soliden Tumor entwickelten (Abb. 4.6 B-D). Dies bedeutet, dass die Rezeptoren TLR2 und TLR4 keinen pro-tumoralen Effekt in WT Mäusen haben. In den 5-fach KO Mäusen beobachten wir einen gegenläufigen Effekt: durch die fehlenden TLR3/7/9-Signale wurde ein anti-tumoraler Effekt hervorgerufen, der durch die fehlenden Signale von TLR2/4 größtenteils aufgehoben wurde. In manchen Tieren schien der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Phänotyp dominant zu sein, da es in einigen Tieren zu einem deutlich geringeren Tumorstadium oder sogar zur Tumorabstoßung kam.



**Abb. 4.5: TLR-Doppel-KO Mäuse entwickeln solide Tumore.**

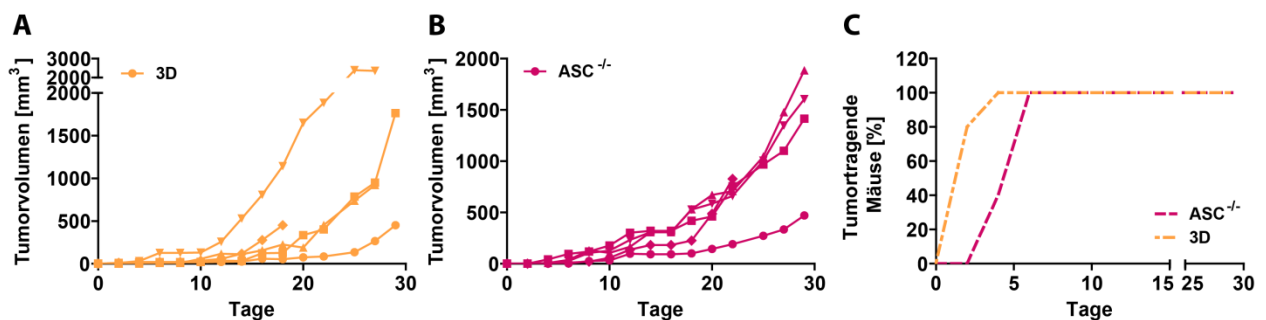
MOPC Zellen wurden s.c. in (A) TLR7/9<sup>-/-</sup>, in (B) TLR3/7<sup>-/-</sup> und in (C) TLR3/9<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert und das Tumorstadium alle 2-3 Tage bestimmt (n=4-6). Der prozentuale Anteil tumortragender Mäuse ist in (D) dargestellt.



**Abb. 4.6: Der Einfluss von TLR2 und TLR4 auf das Tumorstadium.** MOPC Zellen wurden s.c. in (A) TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> (n=26), in (B) TLR2/4<sup>-/-</sup> (n=5) und WT (n=5) sowie in (C) TLR4<sup>-/-</sup> (n=5) und WT Mäuse (n=4) injiziert und das Tumorstadium alle 2-3 Tage bestimmt. (D) Der prozentuale Anteil tumortragender TLR-defizienter Mäusen wurde dargestellt (n=5-26).

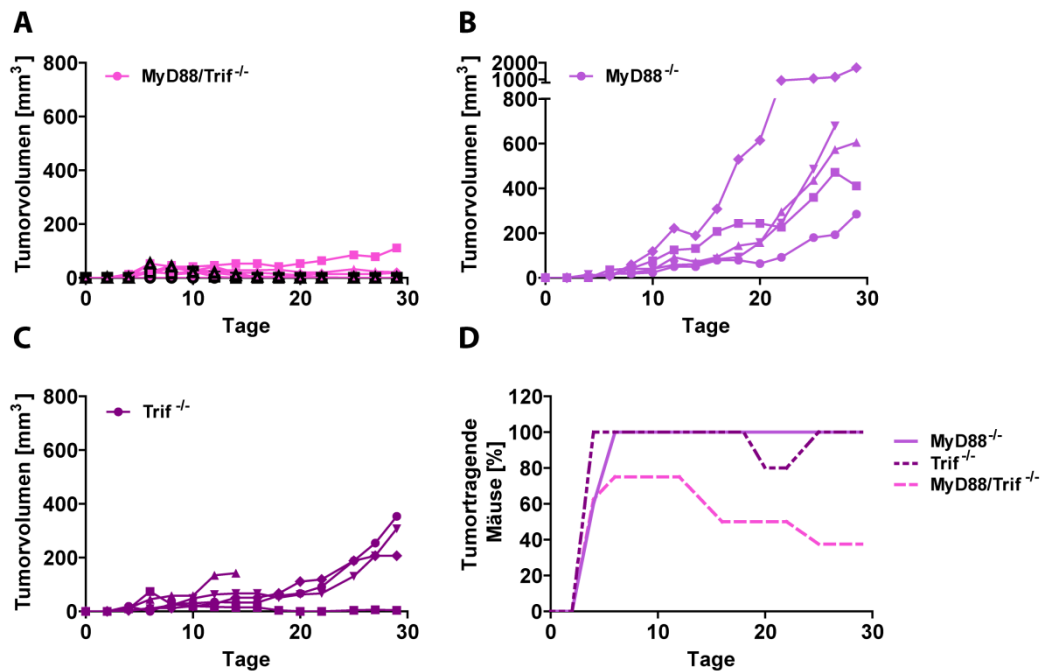
Eine weitere Möglichkeit endosomale TLRs *in vivo* zu untersuchen, stellt die Triple D (3D)-Maus dar, welche einen Defekt in dem Transportprotein UNC93B1 aufweist, wodurch der Transport der TLRs in das Endosomen blockiert wird (Tabeta *et al.*, 2006). Demnach müssten diese Mäuse einen ähnlichen Phänotyp, wie die TLR3/7/9-defizienten Mäuse aufweisen. Überraschenderweise entwickelten alle 3D-Mäuse solide Tumore und es kam zu keiner Tumorabstoßung (Abb. 4.7 A, C). Dies könnte an einer nicht ausreichenden Depletion der TLR3, TLR7 und TLR9 Rezeptoren in der 3D-Maus liegen, was später genauer diskutiert wird (siehe Kapitel 5.4.3).

Durch die Aktivierung von TLRs kann es zur Transkription von Pro-IL-1 $\beta$  und Pro-IL-18 kommen, welche durch einen Proteinkomplex, das Inflammasom, aktiviert werden und als IL-1 und IL-18 in inflammatorischen Prozessen und Tumorentwicklung beteiligt sind (Man and Kanneganti, 2015). Ein essentieller Bestandteil des Inflammasomes ist das ASC-Protein (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain*), welches Caspase 1 rekrutiert, wodurch die proteolytische Spaltung von Pro-IL-1 und Pro-IL-18 stattfindet. Mittels der ASC<sup>-/-</sup> Maus, die einen Defekt in dem ASC Protein hat, sollte die Rolle dieses wichtigen Signalweges untersucht werden. Da alle Mäuse einen soliden Tumor entwickelten und keinerlei Abstoßung zeigten, lässt sich dieser Mechanismus jedoch ausschließen (Abb. 4.7 B, C).



**Abb. 4.7: Keine Tumorabstoßung in ASC<sup>-/-</sup> und 3D-Mäusen.** MOPC<sup>-</sup> Zellen wurden s.c. in (A) 3D-Mäuse (n=5) und (B) ASC<sup>-/-</sup> Mäuse (n=5) injiziert. Das Tumorstadium wurde alle 2-3 Tage bestimmt und der prozentuale Anteil an tumortragenden Mäusen berechnet (C).

Wie die meisten TLRs leiten TLR7 und TLR9 ihr Signal über den MyD88-abhängigen Signalweg weiter, während TLR3 den Trif-abhängigen Signalweg verwendet. Die Einzel- und Doppel-TLR-KO Experimente lassen vermuten, dass die Aktivierung beider Signalwege in einem bestimmten Verhältnis für den Phänotyp in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Tumorwachstum in MyD88/Trif<sup>-/-</sup> Doppel-KO Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass das Fehlen von beiden Adaptermolekülen zu einem sehr geringen Tumorwachstum und vollständiger Tumorregression in der Mehrzahl der Mäuse führte, wodurch nach vier Wochen nur noch 40% der Tiere einen kleinen Tumor aufwiesen (Abb. 4.8 A, D). Welches der beiden Adaptermoleküle eine wichtigere Rolle spielt, zeigten die Untersuchungen in MyD88<sup>-/-</sup> und Trif<sup>-/-</sup> Einzel-KO Mäusen. Während die Tumore in den MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen ungehindert wachsen konnten, entwickelten sich in den Trif<sup>-/-</sup> Mäusen nur kleine Tumore, was zeigt, dass der Trif-abhängige Signalweg eine wichtigere Rolle übernimmt (Abb. 4.8 B, C). Trotz verringertem Wachstum stießen die Trif<sup>-/-</sup> Mäuse die Tumore nicht vollständig ab (Abb. 4.8 D), was bestätigt, dass analog zu dem TLR3/7/9-Knockout die Kombination beider Signalwege notwendig ist.



**Abb. 4.8: Der MyD88 und der Trif Signalweg beeinflussen die Tumorbildung.** MOPC Zellen wurden s.c. in (A) MyD88/Trif<sup>-/-</sup> Doppel-KO Mäuse (n=8), in (B) MyD88<sup>-/-</sup> (n=5) und in (C) Trif<sup>-/-</sup> Mäuse (n=5) injiziert. Das Tumorwachstum wurde alle 2-3 Tage bestimmt und der prozentuale Anteil tumortragender Mäuse berechnet (D).



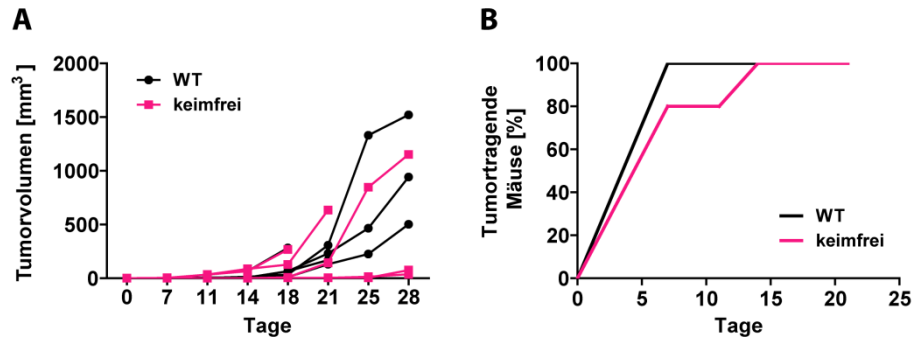
### 4.1.4 Die Rolle von kommensalen Bakterien auf das Tumorwachstum

Kommensale Bakterien kommen in verschiedenen Orten, wie der Haut, dem Mund und dem Verdauungssystem vor. Im menschlichen Darm befinden sich bis zu 100 Billionen Bakterien und zusätzlich noch weitere Mikroorganismen wie Protozoen, Pilze und Archaeen (Lee and Mazmanian, 2010). Während der Darmflora lange Zeit nur lokale Funktionen zugeschrieben wurden, zeigt sich seit einigen Jahren, dass unsere kommensalen Bakterien in vielen Bereichen eine wichtige Rolle spielen. Nicht nur die Aufnahme von Nährstoffen ist je nach Zustand und Zusammensetzung der Darmflora deutlich unterschiedlich, sondern sie beeinflussen auch die Ausbildung des gastrointestinalen Immunsystems. Dabei handelt es sich um eine Symbiose bei der Darmbakterien Rezeptoren auf Immunzellen aktivieren, was zu beiderseitigem Nutzen für Mikroben und Wirt ist (Lee and Mazmanian, 2010). Verschiebt sich das Verhältnis von pathobiotischen und symbiotischen Bakterien zugunsten der pathobiotischen Bakterien, kann dies die Entwicklung von Adenomen und Darmkrebs fördern (Akin and Tozun, 2014). Überraschenderweise konnten Wissenschaftler vor kurzem zeigen, dass die Therapie von subkutanen Tumoren mit dem TLR9-Liganden CpG und Platin-Chemotherapie deutlich schlechter wirkten und das Überleben der Mäuse verringert war, wenn ihre Darmflora durch Antibiotikabehandlung geschädigt wurde (Iida *et al.*, 2013). Zudem beeinflusst die Zusammensetzung der Darmflora die Generierung einer effektiven virus-spezifischen Immunantwort in der Lunge (Ichinohe *et al.*, 2011). Demnach sind Darmbakterien nicht nur für lokale Mechanismen von großer Bedeutung, sondern können auch Vorgänge in anderen Bereichen des Organismus beeinflussen.

Da Bestandteile der Darmbakterien TLRs aktivieren, könnten sie in WT Mäusen zu einer pro-tumoralen Stimulation endosomaler TLRs führen, die in den TLR-defizienten Mäusen nicht stattfinden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. André Bleich an der Medizinischen Hochschule Hannover das Tumorwachstum von MOPC Zellen in keimfreien Mäusen untersucht, die von Geburt an unter sterilen Bedingungen gehalten wurden und weder im Darm noch in anderen Kompartimenten, wie der Haut, Bakterien aufwiesen. Als Kontrolle dienten ursprünglich keimfreie Mäuse, die mit Schädler Flora und gemeinsamer Haltung mit WT Mäusen wiederbesiedelt wurden und somit vergleichbar mit anderen WT Mäusen sind. Es zeigte sich, dass alle keimfreien Mäuse einen Tumor entwickelten und es innerhalb der ersten 20 Tage zu keiner Abstoßung des Tumors kam (Abb. 4.9 A, B). Der Versuch konnte aufgrund von Kontaminationen der Mäuse während des Tumormessens nicht länger als 28 Tage durchgeführt werden. Dennoch zeigte sich deutlich, dass Bakterien das Tumorwachstum in



WT Mäusen nur unwesentlich beschleunigten. Demnach müssen körpereigene Moleküle für die pro-tumorale TLR-Aktivierung in den WT Mäusen verantwortlich sein.



**Abb. 4.9: Kein Einfluss der kommensalen Bakterien auf das Tumorwachstum.** MOPC Zellen wurden s.c. in keimfreie Mäuse und in wiederbesiedelte Kontrollmäuse (WT) injiziert und das Tumorwachstum alle 3-4 Tage kontrolliert (n=5) (A). In (B) wurde die Anzahl tumortragender Mäuse dargestellt.

### 4.1.5 Analyse der Genexpression in der frühen Phase der Tumorabstoßung

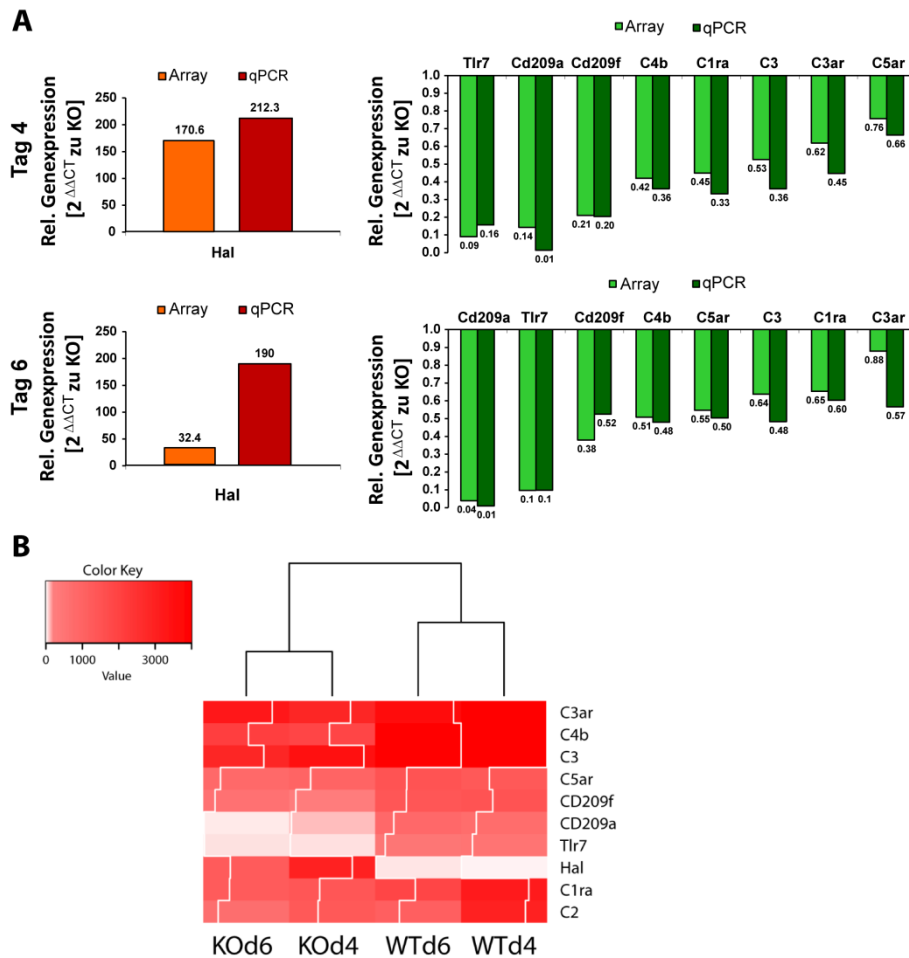
Die vorherigen Versuche mit verschiedenen Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass es sich bei der Abstoßungsreaktion in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen um einen komplexen Prozess handelt. Daher sollten als nächstes die wesentlichen Unterschiede zwischen WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen in der frühen Phase der Tumorentwicklung untersucht werden. Mittels eines Mikroarrays sollten Moleküle, wie Zytokine oder Chemokine, beziehungsweise Subpopulationen von Zellen oder Signalwege identifiziert werden, die die Abstoßungsreaktion erklären können. Dafür wurde RNA von Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen vier oder sechs Tage nach der Tumorzellinjektion isoliert. Der Mikroarray wurde auf einem Affymetrix Chip von dem Institut Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen unter der Leitung von Herrn Dr. Klein-Hitpass durchgeführt und analysiert. Als erstes wurden die Gene ermittelt, die zu beiden Zeitpunkten in den Tumoren aus den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen im Verhältnis zur WT-Situation hoch- oder runterreguliert wurden und in einer Heatmap dargestellt (Abb. 4.10 A). Es zeigte sich, dass es deutliche Unterschiede in der Genexpression in den Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen gab. Anschließend wurden aus diesen Genen die zwanzig am stärksten hoch- bzw. runterregulierten Gene ermittelt. Um zu verhindern, dass deutliche Unterschiede durch den Mittelwert aus Tag 4 und Tag 6 verschwinden, wurden diese Gene für beide Tage separat dargestellt (Abb. 4.10 B). Hier zeigt sich, dass die meisten der Gene an beiden Tagen auf sehr ähnliche Weise reguliert wurden (fett/ farbige Gene). Allerdings befanden sich unter diesen Genen keine



Molekül besitzt, enthält das Genom von Mäusen fünf homologe Gene, wovon aber nur eine Form als murines DC-SIGN bezeichnet wird. Das Protein befindet sich, wie beim Menschen, vor allem auf dendritischen Zellen. Die vier anderen Varianten werden als *SIGNR1- SIGNR4* bezeichnet und kommen vor allem in Makrophagen und Lymphozytenzelllinien vor (Park *et al.*, 2001).

Um weitere interessante Kandidaten zu identifizieren, wurde auf Grundlage der Arraydaten mit der KEGG-Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) die am stärksten regulierten Signalwege identifiziert. Es zeigte sich, dass sich vor allem das Komplementsystem in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> und WT Mäusen unterschied. Tatsächlich waren mehrere Komponenten des Komplementsystems unter den zwanzig am stärksten runterregulierten Genen in den Tumoren der TLR-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Tumoren der WT Mäuse (Abb. 4.10 B). Dies bedeutet, dass es in der frühen Phase der Tumorentwicklung in der WT-Situation zu einer verstärkten Aktivierung des Komplementsystems kommt, wodurch oder trotz dem es zum Auswachsen der Tumore kommt.

Die Daten aus der Arrayanalyse wurden für die beiden am stärksten regulierten Gene, sowie für die regulierten Gene des Komplementsystems mittels qRT-PCR verifiziert. Die im Array ermittelten Unterschiede waren in der qRT-PCR reproduzierbar und zeigten zum Teil stärkere Unterschiede, als es im Array ersichtlich war (Abb. 4.11 A). Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden zur Verdeutlichung in einer Heatmap dargestellt (Abb. 4.11 B). Hier wird ersichtlich, dass die extremen Unterschiede in der *Hal* und *CD209a* Expression vor allem dadurch zustande kamen, dass *Hal* in den Tumoren der WT-Mäuse gar nicht exprimiert wurde und *CD209a* in den Tumoren der TLR-defizienten Mäuse kaum messbar war.



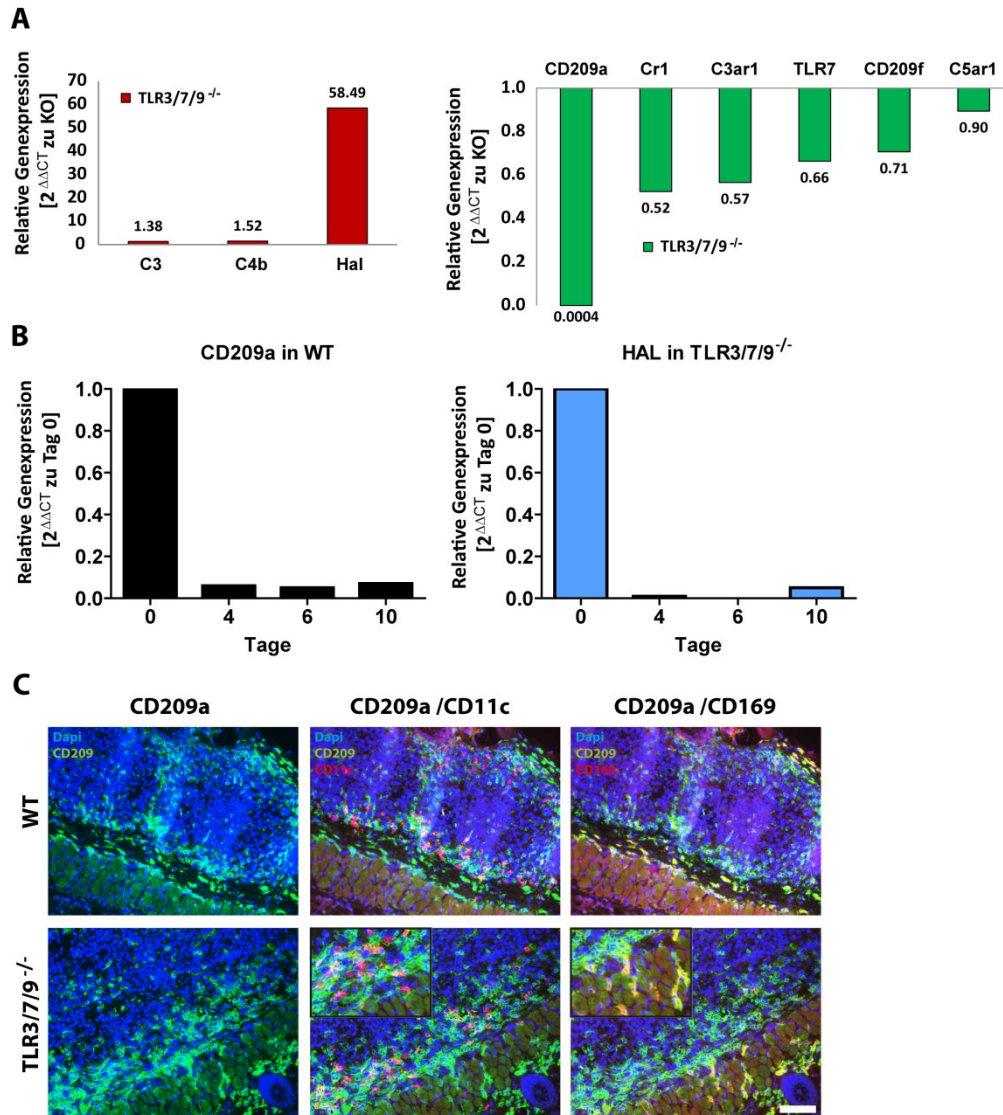
**Abb. 4.11: Verifizierung der Arraydaten mittels qRT-PCR.** (A) Die Expression ausgewählter Genen wurde mittels qRT-PCR überprüft. Gezeigt ist die relative Genexpression in den Tumoren der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse im Verhältnis zu der Expression in den Tumoren der WT Mäuse an Tag 4 und an Tag 6 (cDNA-Pool aus 2-3 Mäusen). Hochregulierte Gene sind in orange (Array) oder rot (qPCR) dargestellt und runterregulierte Gene sind hellgrün (Array) bzw. dunkelgrün (qPCR) dargestellt. (B) Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden in einer Heatmap dargestellt.

Eine wesentliche Frage bei der Interpretation dieser Daten ist, ob es sich um Unterschiede in dem Tumor handelt oder ob es bereits intrinsische Unterschiede in der Haut der beiden Mäuse gibt. Daher wurde RNA aus dem Unterhautgewebe von naiven Mäusen isoliert, dem Milieu in dem sich sonst die Tumore entwickeln, und die Expression der ausgewählten Gene mittels qRT-PCR analysiert. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass die am stärksten regulierten Gene, *Hal* und *CD209a/CD209f* bereits in der Haut deutliche Expressionsunterschiede zeigten (Abb. 4.12 A). Wird die Expression im Zeitverlauf dargestellt, zeigt sich sogar, dass der Unterschied in der Haut am größten ist (Abb. 4.12 B). Es handelt sich also um keine spezielle veränderte Genexpression unter Tumoreinfluss, sondern um einen intrinsischen Unterschied zwischen den beiden Mäusen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht systemisch, da sich das Genexpressionsprofil in der Leber von

der in der Haut unterscheidet (Daten nicht gezeigt). Dies muss bei der Interpretation der Arraydaten berücksichtigt werden.

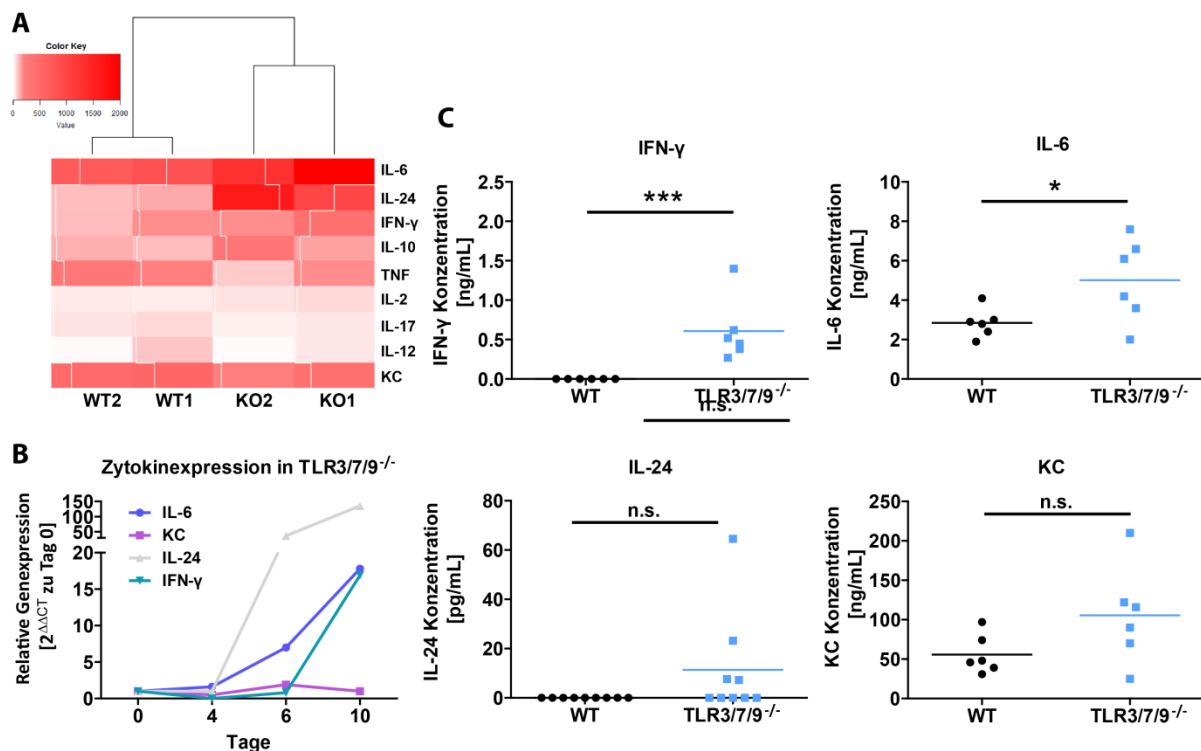
Um die deutlichen Unterschiede in der *CD209a*-Expression auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Gewebeschnitte von Tumoren zusammen mit der Haut immunhistochemisch untersucht. Tumore aus der frühen Wachstumsphase (Tag 3) wurden mit dem anti-*CD209a* Antikörper gefärbt (Abb. 4.12 C). Überraschenderweise wurden nicht nur in der Haut und dem Tumor der WT Mäuse *CD209a*<sup>+</sup> Zellen gefunden, sondern auch in den Geweben TLR-defizienter Mäuse. Dreifachfärbungen mit anti-*CD11c* zeigte keine Kolo-kalisation von *CD209* und *CD11c*, obwohl die Expression von *CD209a* auf *CD11c*<sup>+</sup> DCs beschrieben ist. Da *CD209a* auch von *CD169*<sup>+</sup> Makrophagen exprimiert werden kann, wurde eine Dreifachfärbung mit dem anti-*CD169* Antikörper durchgeführt. Es zeigte sich, dass die *CD169*<sup>+</sup> Makrophagen *CD209a* exprimierten, allerdings waren auch viele *CD209a*<sup>+</sup> Zellen nicht mit *CD169* kolo-kalisiert. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse auf RNA- und Proteinebene, sowie die deutlichen Unterschiede auf RNA-Ebene in der Haut naiver Mäuse, wurden diese Befunde aus der Arrayanalyse nicht weiterverfolgt.

Um dennoch Informationen aus dem Array gewinnen zu können, wurden die Daten erneut analysiert. Da die Expression von Zytokinen erst an Tag 6 und noch nicht an Tag 4 beginnen könnte, wurden die Arraydaten von Tag 6 hinsichtlich der Zytokinexpression separat analysiert und in einer Heatmap dargestellt (Abb. 4.13 A). Deutliche Unterschiede in der Genexpression zeigten sich vor allem in den Zytokinen IL-6, IL-24 und IFN- $\gamma$ . Die Expression dieser Gene wurde mittels qRT-PCR im Zeitverlauf verifiziert. Abbildung 4.13 B zeigt, dass es relativ zu Tag 0, also Haut ohne Tumor, zu einer verstärkten Expression von IL-6, IL-24 und IFN- $\gamma$  kommt. Die Unterschiede an Tag 6 steigern sich an Tag 10 noch einmal deutlich. Die Expression von KC ist in Übereinstimmung mit den Arraydaten nicht verändert. Um diese Unterschiede auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Überstände von *ex vivo* kultivierten Tumoren (Tag 10) mittels ELISA untersucht. In dem Überstand von Tumoren aus TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen konnten erhöhte Konzentrationen aller vier Zytokine (IL-6, IL-24, IFN- $\gamma$  und KC) nachgewiesen werden (Abb. 4.13 C). Die deutlichsten Unterschiede waren in der IL-6 und vor allem in der IFN- $\gamma$  Sekretion messbar. Eine signifikant erhöhte Menge IFN- $\gamma$  war bereits im Überstand von *ex vivo* kultivierten Tumoren von Tag 6 messbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.12: Intrinsische Unterschiede in der Genexpression bei WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) Relative Genexpression des Unterhautgewebes in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen (cDNA-Pool aus 3 Mäusen). Hochregulierte Gene sind rot und runterregulierte Gene sind grün dargestellt. (B) Die Expression der Gene *CD209a* und *Hal* wurden an Tag 0 (Haut ohne Tumor) und in Tumoren an Tag 4, Tag 6 und Tag 10 nach Tumorzellinjektion mittels qRT-PCR bestimmt. Berechnet wurde die relative Expression von *CD209a* zu Tag 0 in WT Mäusen und die relative Expression von *Hal* zu Tag 0 in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (cDNA-Pool aus 3 Mäusen). (C) Die Expression von CD209a auf Proteinebene wurde auf Gefrierschnitten von Tumoren inkl. Haut (Tag 3) durch Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-CD209a (grün) und Dapi (blau) untersucht. Zudem wurden Dreifachfärbungen mit anti-CD11c (rot, mittig) oder anti-CD169 (rot, rechts) durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

IL-6 kontrolliert den Übergang von angeborener zu adaptiver Immunität, indem es zur Rekrutierung, Aktivierung und Apoptose von Leukozyten führt (Jones, 2005). IFN- $\gamma$  wird vor allem von den Th1-Zellen sezerniert und fördert charakteristische Th1-Effektormechanismen, wie die Aktivierung von Makrophagen. Es hat antimikrobielle, immunregulatorische und anti-tumorale Eigenschaften (Schroder *et al.*, 2004). Die erhöhte Konzentration dieser Zytokine an sechs und zehn Tagen nach der Tumorzellinjektion auf RNA und Proteinebene spricht demnach für die Induktion einer klassischen zellulären gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Um zu überprüfen, ob das Fehlen der Rezeptoren TLR3, TLR7 und TLR9 auf Immunzellen oder nicht-hämatopoetischen Stromazellen für die Abstoßung verantwortlich ist, sollten im Folgenden Knochenmarkchimären untersucht werden.



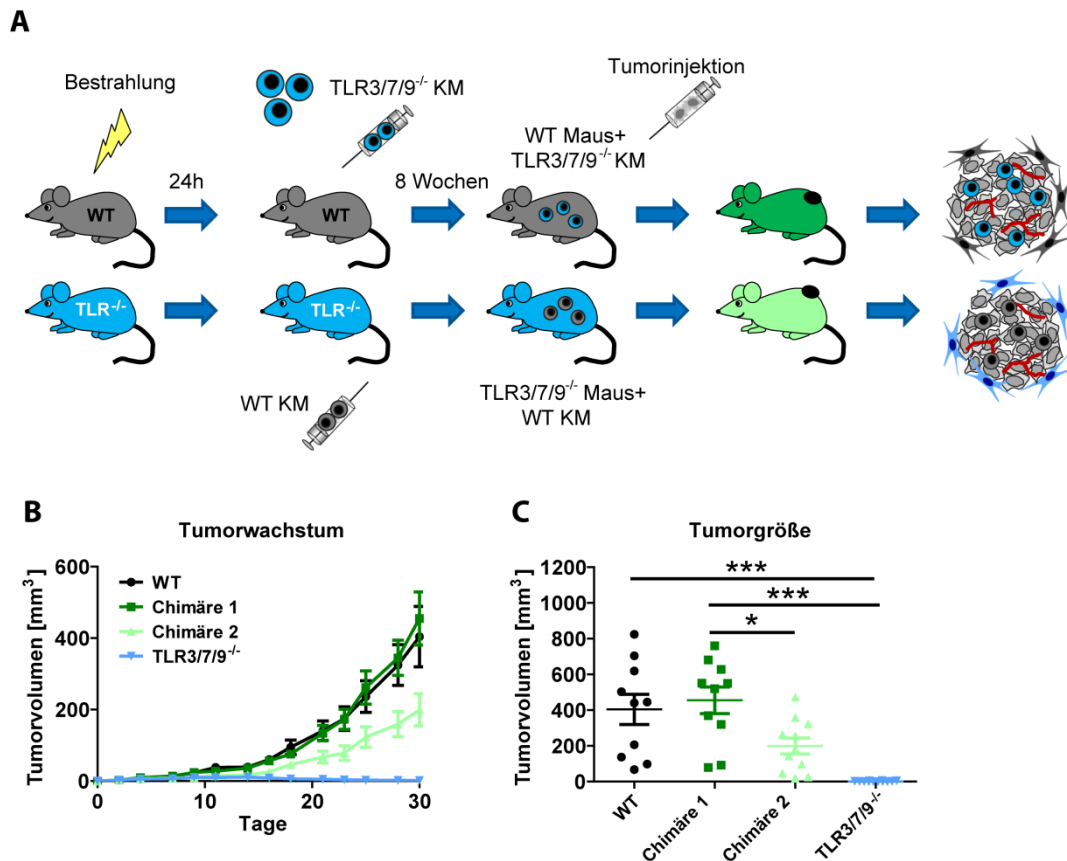
**Abb. 4.13: Tumore aus TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen produzieren erhöhte Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen.** (A) In einer Heatmap wurde die Zytokin-Expression an Tag 6 in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen auf Grundlage der Arraydaten dargestellt. (B) Die Expression von IL-6, IL-24, IFN- $\gamma$ , und KC wurde mittels qRT-PCR verifiziert. Dargestellt ist die Expression im Zeitverlauf (Tag 4 bis Tag 10) im Verhältnis zur Expression in der Haut (Tag 0) in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (cDNA-Pool aus 3 Mäusen). (C) Zehn Tage nach der Injektion wurden die Tumore aus WT und TLR<sup>-/-</sup> Mäusen explantiert und ex vivo in Zellkulturmedium (20 mg/ml) für 48 h kultiviert. Der Überstand wurde mittels ELISA hinsichtlich der Sekretion von KC, IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-24 analysiert (n=6-9). Statistische Signifikanz wurde mit p<0,05 erreicht (Student's t-Test).

## 4.2 Die Rolle der Kompartimente der Tumormikroumgebung

### 4.2.1 Welches Zellkompartiment des Tumorstromas induziert die Abstoßungsreaktion?

Die Generierung von Mauschimären ist eine häufig angewendete Methode, um den Einfluss von Zellen des hämatopoetischen Systems zu untersuchen. Das Knochenmark der WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Empfängermause wurde durch Bestrahlung zerstört und nach 24 Stunden durch neues Knochenmark von Spendermäusen ersetzt (Abb. 4.14 A). Die Chimären aus der ersten Gruppe (Chimäre 1) waren WT Mäuse, die Knochenmark von TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen erhielten (dunkelgrün). Diese Mäuse bildeten TLR-defiziente Immunzellen aus, wohingegen auf den nicht-hämatopoetischen Kompartimenten alle TLRs vorhanden waren. Als Gegenstück wurde eine zweite Gruppe von Chimären generiert (Chimäre 2), in der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse WT Knochenmark erhielten (hellgrün). Diese Mäuse entwickelten Immunzellen, die TLR3, TLR7 und TLR9 exprimierten, während auf allen anderen Zellen des Körpers diese Rezeptoren nicht vorhanden waren. In den Kontrollgruppen erhielten die bestrahlten Mäuse Knochenmark aus Mäusen mit dem gleichen Genotyp (schwarz, blau). Damit die Mäuse ein neues Immunsystem entwickeln konnten, wurden erst acht Wochen nach dem Knochenmarktransfer MOPC-Tumorzellen s.c. injiziert und deren Wachstum aufgezeichnet (Abb. 4.14 B). Die Wachstumskurven und das Tumolvolumen 30 Tage nach Injektion zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Chimären im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen (Abb. 4.14 B, C). Es zeigte sich, dass die transferierten TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Immunzellen in den WT Mäusen das Tumorstromawachstum nicht verhindern konnten (dunkelgrün), sodass die Chimären ein mit den WT Tieren vergleichbares Tumorstromawachstum zeigten. In ähnlicher Weise verhinderte die Expression der TLRs auf Immunzellen in allen TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen die Abstoßung der Tumore (hellgrün), jedoch bildeten diese Chimären deutlich kleinere Tumore als die WT Mäuse aus. Dieses Ergebnis zeigte, dass TLR-Defizienz auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Stromazellen für eine effiziente Tumorstromaregression notwendig war und legt ein Zusammenwirken beider Komponenten nahe. Im weiteren Projektverlauf sollten die Mechanismen der Tumorstromaabstoßung weiter untersucht werden. Dabei sollte insbesondere analysiert werden, auf welche Weise hämatopoetisches und nicht-hämatopoetisches Stroma zur Tumorstromaregression beitragen.



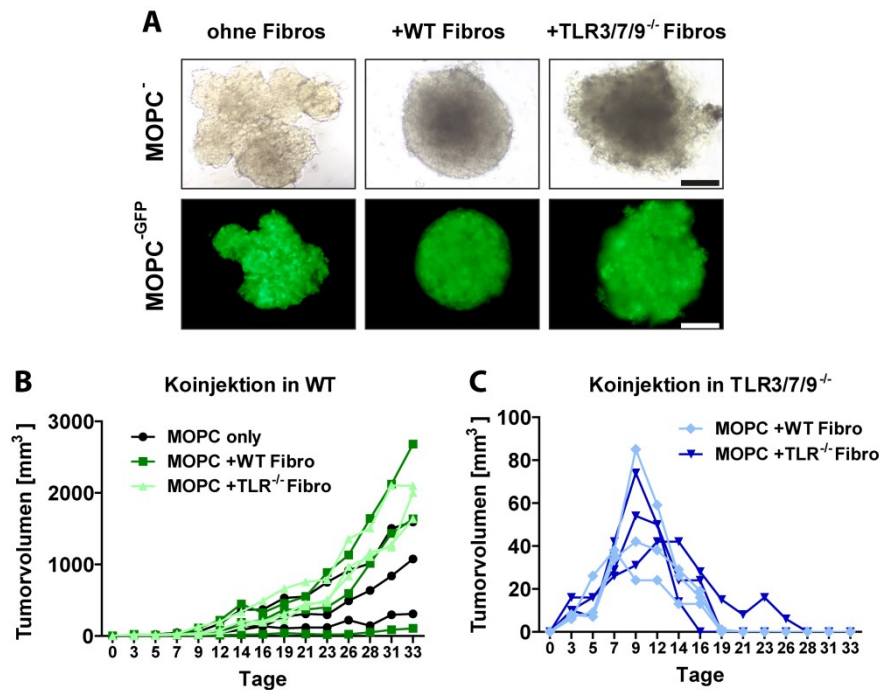


**Abb. 4.14:** Für die Tumorregression ist die Kooperation von TLR-defizienten Immunzellen und TLR-defizientem nicht-hämatopoetischem Stroma notwendig. (A) Schema der Generierung von Knochenmarkchimären. Durch Bestrahlung und anschließendem Knochenmarktransfer wurden Mausechimären generiert: WT Mäuse erhielten Knochenmark (KM) von TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (Chimäre 1, dunkelgrün) und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten Knochenmark von WT Mäusen (Chimäre 2, hellgrün). Als Kontrollen erhielten bestrahlte WT und TLR-defiziente Mäuse Knochenmark mit demselben Genotyp (schwarz, blau). (B) Das Tumorstadium wurde alle 2-3 Tage bestimmt und der Wachstumsverlauf aufgezeichnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. (C) Die Einzelmessungen der Tumore 30 Tage nach der Tumoringinjektion wurden aufgetragen. Für die statistische Analyse wurde die einfaktorielle ANOVA verwendet.

#### 4.2.2 Veränderungen im nicht-hämatopoetischen Stroma in Tumoren der TLR-defizienten Mäusen

Das zelluläre nicht-hämatopoetische Kompartiment des Tumorstromas besteht vor allem aus Fibroblasten und Gefäßen. Um herauszufinden welche dieser Zelltypen durch das Fehlen der endosomalen TLRs verändert sind, wurden als erstes Fibroblasten untersucht. Diese wurden aus der Haut von naiven WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen gewonnen, kultiviert und anschließend in einem *ex vivo* Assay eingesetzt. Dazu wurden Fibroblasten zusammen mit MOPC<sup>-</sup> oder MOPC<sup>-GFP</sup> Zellen unter Bedingungen kultiviert, unter denen sie Sphäroide bilden konnten (Sphäroidassay). WT Fibroblasten formten runde, kompakte Sphäroide,

während TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Fibroblasten eine deutlich lockerere Struktur aufwiesen (Abb. 4.15 A). Dies könnte auf eine geringere Expression von Adhäsionsmolekülen auf den TLR-defizienten Fibroblasten hindeuten. Andererseits zeigten die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Fibroblasten in der Zellkultur in späteren Passagen ein verringertes Wachstum verglichen mit den WT Fibroblasten (Daten nicht gezeigt).

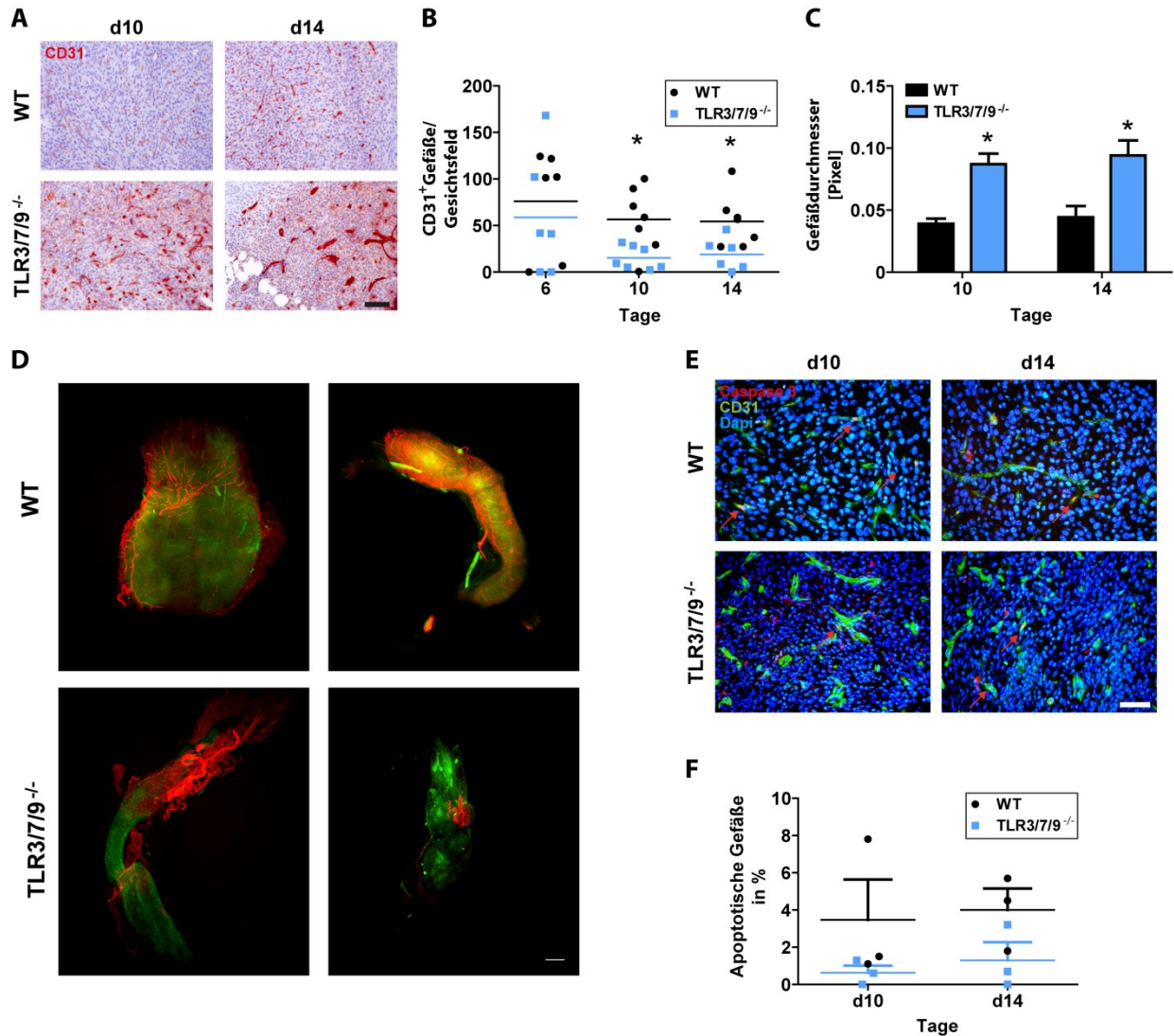


**Abb. 4.15: Kein Einfluss von Hautfibroblasten auf das Tumorstadium.** Fibroblasten wurden aus der Haut von WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen *ex vivo* gewonnen und kultiviert. (A) WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Fibroblasten (Fibros) in der 7. Passage wurden zusammen mit MOPC<sup>-</sup> oder MOPC<sup>-GFP</sup> Zellen in einem 1:1 Verhältnis in einem Sphäroidassay für 4 Tage kultiviert. Als Kontrolle wurden die Tumorzellen alleine kultiviert. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm. Gezeigt sind repräsentative Beispiele. (B, C) WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Fibroblasten aus der 6. Passage wurden zusammen mit MOPC<sup>-</sup> Zellen in einem 1:2 Verhältnis (1 Fibroblast : 2 Tumorzellen) in WT Mäuse (B) und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse (C) s.c. injiziert. Das Tumorstadium wurde alle 2-3 Tage bestimmt und aufgezeichnet.

Um zu untersuchen, ob sich diese Unterschiede der Fibroblasten auf das Tumorstadium *in vivo* auswirken, wurden MOPC<sup>-</sup> Zellen zusammen mit WT oder TLR-defizienten Fibroblasten in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse s.c. injiziert. Weder beschleunigten die WT Fibroblasten das Tumorstadium in den WT Mäusen, noch vermochten die TLR-defizienten Fibroblasten das Tumorstadium in WT Mäusen zu verringern (Abb. 4.15 B). Auch bildeten alle TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse Tumore aus, die sie anschließend abstießen, unabhängig davon, ob die Tumorzellen zusammen mit WT oder TLR-defizienten Fibroblasten injiziert worden waren (Abb. 4.15 C). Demnach scheinen Fibroblasten in diesem Koinjektionsmodell keinen wesentlichen Einfluss auf die Tumorentwicklung zu haben.

Als nächstes sollte das Gefäßsystem untersucht werden, da es einen weiteren großen Teil des nicht-hämatopoetischen Tumorstromas ausmacht. Zudem ist Angiogenese, also die Ausbildung von neuen Blutgefäßen, essentiell für Tumorstromawachstum und Metastasierung. Die Endothelzellen der Gefäße von Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen wurden in der Abstoßungsphase (Tag 10 und Tag 14) immunhistochemisch gefärbt. Dabei zeigten sich bereits makroskopisch deutliche Unterschiede in Anzahl und Volumen der Gefäße (Abb. 4.16 A). Die Quantifizierung bestätigte, dass die Tumore der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse von weniger Gefäßen versorgt wurden, welche im Vergleich zu den WT Gefäßen doppelt so dick waren (Abb. 4.16 B, C). Diese Befunde wurden bei Tumoren in der Abstoßungsphase (Tag 10) mit der 3D Lightsheet-Mikroskopie überprüft und bestätigt. Die Tumore aus WT Mäusen bildeten ein gleichmäßiges Gefäßnetzwerk aus, während die Tumore aus den TLR-defizienten Mäusen ein sehr heterogenes Gefäßsystem aufwiesen, welches einige Bereiche des Tumors nicht versorgte (Abb. 4.16 D und Video 1-4 auf der CD). Dies könnte daran liegen, dass die Gefäße in der TLR-defizienten Mikroumgebung vermehrt sterben. Die Doppelfärbung von CD31 (Endothelzellen) und Caspase 3 (Zelltod) zeigte jedoch keine Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Endothelzellen zwischen Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 4.16 E, F).

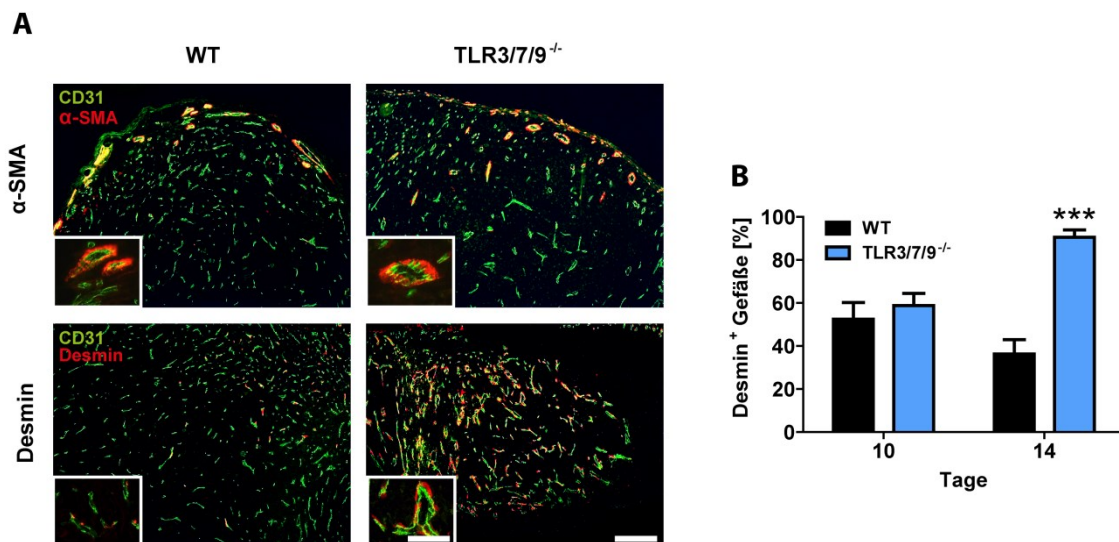
Gefäße bestehen nicht nur aus Endothelzellen, sondern sind außen von perivaskulären Zellen umgeben. Während die Endothelzellen kleinerer Gefäße von einer Basallamina und einzelnen Perizyten bedeckt sind, werden größere Gefäße von mehreren Schichten glatter Muskulatur sowie elastischen und kollagenen Fasern umgeben. Perizyten ummanteln die Endothelzellen und stehen über „Gap Junctions“ im engen Austausch mit ihnen (Bergers and Song, 2005). Um die Gefäße weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene Marker für perivaskuläre Zellen verwendet: Desmin und  $\alpha$ -SMA, beides kontraktile Filamente und PDGFR $\beta$ , ein Oberflächenprotein (Bergers and Song, 2005). Die Färbung und Auswertung erfolgte in Kooperation mit PD Dr. Iris Helfrich aus der Dermatologie am Universitätsklinikum Essen.



**Abb. 4.16: Tumore aus TLR-defizienten Mäusen weisen ein verändertes Gefäßsystem auf.** (A) In Gefrierschnitten von Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen wurden die Gefäße mit dem anti-CD31 Endothelzellmarker gefärbt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel von Tag 10 und Tag 14. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Quantifizierung der Anzahl CD31<sup>+</sup> Gefäße an Tag 6, Tag 10 und Tag 14 (n=6-7). Ausgewertet wurden vier Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. (C) Quantifizierung des Gefäßdurchmessers an Tag 10 und Tag 14 (n=3). Dargestellt ist der Mittelwert +SEM. (D) 3D-Tumoranalyse mit der Lightsheet-Mikroskopie. MOPC<sup>GFP</sup> Zellen (grün) wurden s.c. in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert und zehn Tage später wurden die Gefäße der Mäuse mit dem Alexa Fluor 647 anti-CD31 Antikörper (rot) angefärbt. Anschließend wurden die Tumore entnommen und durch „Clearen“ transparent. Dargestellt sind je zwei repräsentative Aufsichten auf 3D-Darstellungen der Tumore aus WT und TLR-defizienten Mäusen (n=3). (E) Die Immunfluoreszenzfärbung von Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 10 und Tag 14 erfolgte mit anti-Caspase 3 (rot), anti-CD31 (grün) und Dapi (blau). Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel bei 400-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. (F) Die Quantifizierung von Caspase3<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>-doppeltpositiven Zellen erfolgte anhand von vier repräsentativen Fotos bei 400-facher Vergrößerung. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test.

$\alpha$ -SMA war ausschließlich in großen Gefäßen im Randbereich der Tumoren und gleichermaßen in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen vorhanden (Abb. 4.17 A). PDGFR $\beta$  positive Zellen konnten hingegen nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war die Anzahl der Gefäße, die von Desmin<sup>+</sup> Perizyten umgeben waren, in den Tumoren aus TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu der WT-Situation an Tag 14 signifikant erhöht (Abb. 4.17 A, B).

Diese Untersuchung machen deutlich, dass in Mäusen ohne endosomale TLRs das nicht-hämatopoetischen Stroma deutliche Veränderungen aufweist, welche die Tumorprogression beeinflussen könnten. Das Chimärenexperiment und das Zytokinexpressionsprofil zeigten, dass auch das hämatopoetische Kompartiment entscheidend für die Tumorabstoßung ist. Daher wurden die Immunzellen der Mäuse hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens, ihrer Anzahl und Aktivierung untersucht.



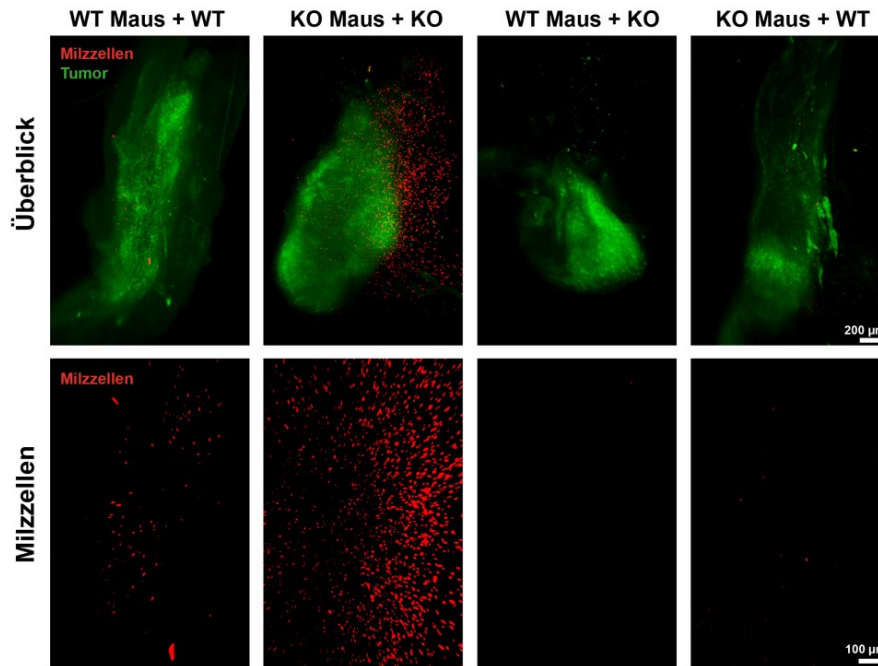
**Abb. 4.17: Charakterisierung des Tumorgefäßsystems in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** Gefrierschnitte von Tumoren an Tag 10 und Tag 14 wurden hinsichtlich der Kolo-kalisation von Endothelzellen mit Perizyten untersucht. (A) Obere Reihe: Die Tumore wurden mit  $\alpha$ -SMA (rot) und CD31 (grün) gefärbt. Untere Reihe: Perizyten wurden mit Desmin (rot) zusammen mit CD31 (grün) gefärbt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel von Tag 14; der Maßstabsbalken entspricht in der Übersicht 200  $\mu$ m und in dem Ausschnitt 50  $\mu$ m. (B) Quantifizierung von Desmin<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen in Tumoren an Tag 10 und Tag 14 von vier repräsentativen Bereichen bei 400-facher Vergrößerung. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  erreicht (Student's t-Test).

### 4.2.3 Verstärkte Immunzellrekrutierung zu Tumoren aus TLR-defizienten Mäusen

Das Migrationsverhalten der Immunzellen wurde durch einen Immunzelltransfer und mittels 3D Lightsheet-Mikroskopie analysiert. Dazu wurden grünfluoreszierende MOPC-GFP Zellen s.c. in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert. Aus Spendermäusen wurden zehn Tage nach der Injektion die Milzen entnommen und die Zellen isoliert. Die Milzzellen wurden mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff markiert und intravenös (i.v.) in die Empfänger-mäuse injiziert, in die sechs Tage zuvor Tumorzellen s.c. injiziert wurden. Dieser Zeitpunkt wurde durch Vorversuche bestimmt, um den optimalen Zeitpunkt zwischen anfänglichem Tumorwachstum und bereits beginnender Abstoßung zu ermitteln. Einen Tag später wurden die Mäuse perfundiert, der Tumor entnommen, schrittweise „gecleart“ und anschließend im Lightsheet- Mikroskop aufgenommen. Die 3D-Aufnahmen zeigten, dass zu den Tumoren in den WT Mäusen kaum Milzzellen rekrutiert wurden, wohingegen in und vor allem um die Tumore aus den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen eine sehr große Anzahl an Milzzellen zu finden waren (Abb. 4.18 und Video 5-8 auf der CD). Überraschenderweise konnten keine oder nur vereinzelte Milzzellen in den Tumoren der beiden Chimären gefunden werden. Weder kam es zur Infiltration von markierten Immunzellen, noch akkumulierten sie sich am Rand des Tumors. Demnach werden WT Immunzellen weder in WT Mäusen noch in TLR-defizienten Mäusen zu dem Tumor rekrutiert.

Dieser Versuch zeigt, dass das Immunsystem der TLR-defizienten Mäuse verändert auf den Tumor reagiert. Die starke Rekrutierung der Immunzellen kann ein wichtiger Faktor in dem Abstoßungsprozess darstellen. In Übereinstimmung mit dem Chimärenexperiment (Abb. 4.14) wird deutlich, dass es nur in einer ganz spezifischen Situation zur Rekrutierung von Immunzellen und zur Tumorabstoßung kommt: Immunzellen und nicht-hämatopoetische Zellen des Tumorstromas müssen beide einen Defekt in der endosomalen TLR-vermittelten Signalerkennung aufweisen!

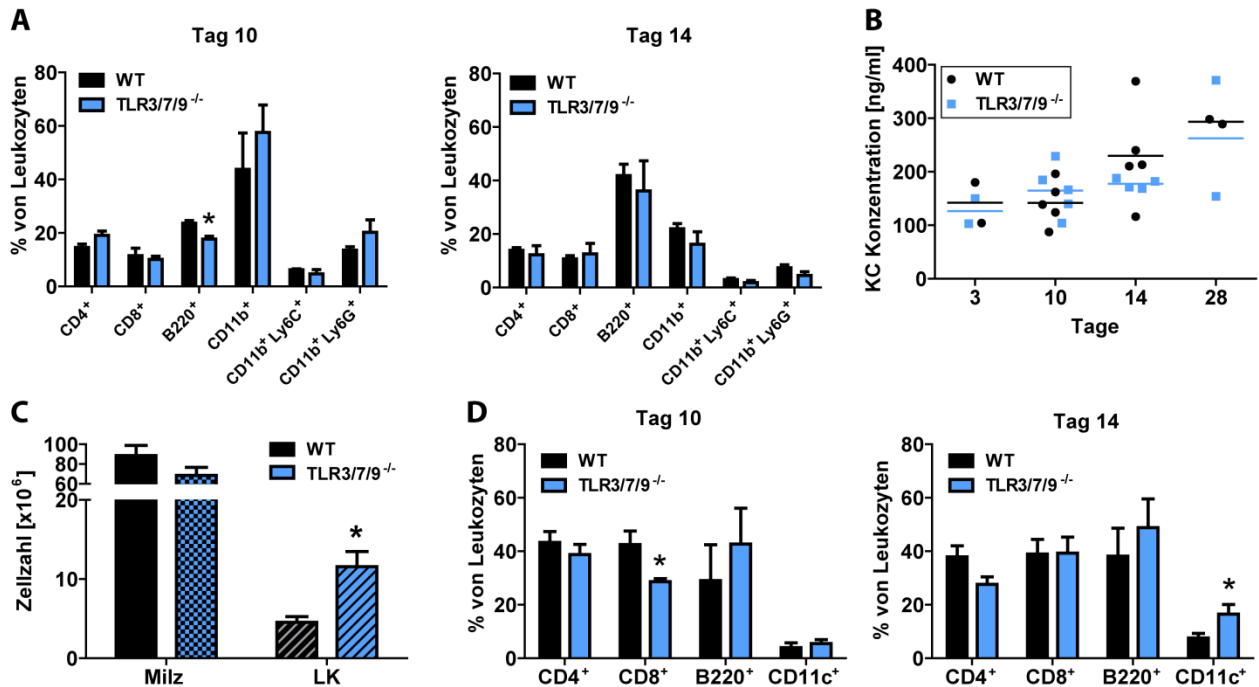




**Abb. 4.18: TLR-Defizienz auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen ist für die starke Infiltration des Tumors mit Immunzellen notwendig.** MOPC<sup>-GFP</sup> Zellen wurden s.c. in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert. Aus tumortragenden Spendermäusen wurden Milzzellen isoliert und mit dem CellTracker™ Deep Red Dye markiert. Die markierten Immunzellen wurden i.v. in tumortragende Empfänger-mäuse transferiert. Einen Tag später wurden die Tumore durch chemisches „Clearen“ transparent und in dem Lightsheet-Mikroskop analysiert. Dargestellt ist die Aufsicht auf die 3D-Darstellung der im Lightsheet-Mikroskop generierten Aufnahmen der Tumore nach dem Transfer von markierten Milzzellen (n=1). Obere Reihe: Übersichtsaufnahme des Tumors (grün) und infiltrierenden Milzzellen (rot). Untere Reihe: die Nahaufnahme zeigt nur die Milzzellen.

#### 4.2.4 Keine systemische Aktivierung von Immunzellen

In jungen TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen bis zu einem Alter von 6 Monaten konnten keine Unterschiede in der Anzahl und Aktivierung von Immunzellen festgestellt werden (Yu *et al.*, 2012b). Um zu untersuchen, ob die Ausbildung eines Tumors periphere Immunzellen beeinflusst, wurde das Blut von WT und TLR-defizienten Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. Während an Tag 10 der prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Lymphozyten in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen leicht erhöht war, war die Anzahl der B-Zellen signifikant verringert. Diese Unterschiede waren an Tag 14 jedoch nicht mehr vorhanden (Abb. 4.19 A). An Tag 3 und Tag 28 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den prozentualen Anteilen von Immunzellen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.19: Analyse des Blutes und sekundärer lymphatischer Organe.** (A) Durchflusszytometrische Analyse von Blut tumortragender WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse zehn und vierzehn Tage nach der Tumordinjektion. Die Anzahl positiver Zellen sind in Prozent zur gesamten Leukozytenzahl angegeben (n=3-5). Dargestellt ist der Mittelwert + SEM. (B) Serum aus tumortragenden WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Tumordinjektion (Tag 3, Tag 10, Tag 14, Tag 28) gewonnen und die Konzentration von KC mittels ELISA bestimmt (n=2-5). Die Linien stellen den Mittelwert dar. (C) Milzen und Lymphknoten (LK) wurden von tumortragenden Mäusen (Tag 10) entnommen und die Zellen vereinzelt. Die Anzahl von Lymphozyten wurde in der Milz (n=4-5) und in den Lymphknoten (n=5-6) mit dem Casy Zellzähler bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM. (D) Durchflusszytometrische Analyse der Zellen des Lymphknotens aus tumortragenden Mäusen (Tag 10 und Tag 14). Die Anzahl von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> Zellen wurde in Prozent zu der Gesamtzahl an Leukozyten angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM. Statistische Signifikanz wurde mit p<0,05 erreicht (Student's t-Test).

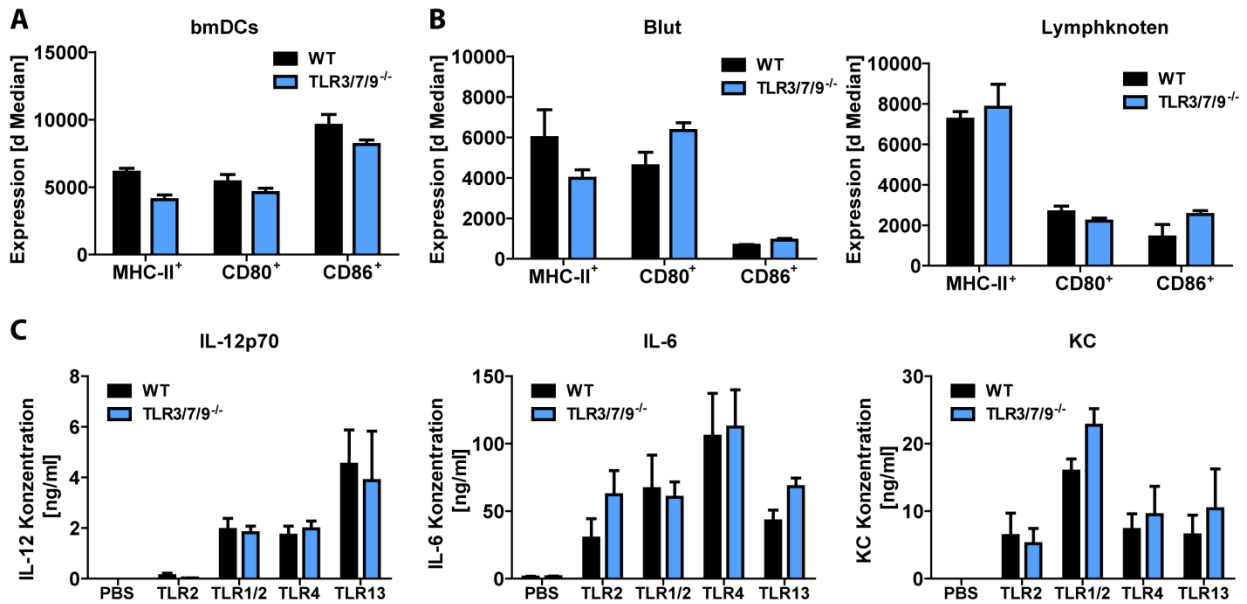
Da es sich bei diesen Daten um prozentuale Anteile und nicht um die Gesamtzahl an Lymphozyten handelt, wurde eine systemische Immunaktivierung durch Messung von Zytokinen im Serum der Mäuse überprüft. Die Konzentration von KC, das murine Analogon zu dem humanen IL-8, nahm im Laufe der Tumorentwicklung zu, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 4.19 B). Die Zytokine IL-6, IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  sowie das Chemokin CXCL-10 konnten mittels ELISA im Serum nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten deuten darauf hin, dass es zu keiner systemischen Aktivierung der Immunzellen in den TLR-defizienten Mäusen kam. Auch unterschied sich die Anzahl der Milzzellen an Tag 10 kaum (Abb. 4.19 C).

Interessanterweise enthielten die drainierenden Lymphknoten etwa doppelt so viele Zellen wie die WT Lymphknoten. Dies beweist, dass es in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen doch zu einer



verstärkten Immunreaktion kommt, diese jedoch lokal in den nahe gelegenen Lymphknoten stattfindet. Eine erhöhte prozentuale Anzahl von T-Zellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>) in den Lymphknoten der TLR-defizienten Mäuse konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 4.19 D). Der Anteil an zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) war zehn Tage nach der Tumordinjektion sogar verringert, was in einer verstärkten Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen zum Tumor begründet liegen könnte. Der Anteil von B-Zellen (B220<sup>+</sup>) war zu beiden Zeitpunkten in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen leicht erhöht, was für die Proliferation der Zellen in den Keimzentren spricht und somit für eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Für eine Tumor-induzierte Immunreaktion spricht vor allem die erhöhte Anzahl der DCs an Tag 14.

Da DCs eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems spielen, könnte es sein, dass die Tumorabstoßung in der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Maus durch eine Hyperaktivierung der DCs vermittelt wird. Demnach würden die TLR-defizienten Mäuse das Fehlen dieser Rezeptoren durch eine erhöhte Sensitivität anderer Rezeptoren, zum Beispiel Oberflächen-TLRs, ausgleichen und im Fall der Tumordinjektion verstärkt auf diesen Stimulus reagieren. Um zu überprüfen, ob die DCs in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen in ihrem Grundzustand bereits verstärkt aktiviert sind, wurden aus Knochenmark von naiven Mäusen *ex vivo* DCs generiert (bmDCs) und ihr Aktivierungsstatus durchflusszytometrisch untersucht. TLR3/7/9<sup>-/-</sup> bmDCs zeigten jedoch im Vergleich zu der WT-Situation keine verstärkte Expression der Aktivierungsmarker MHC-II, CD80 und CD86 (Abb. 4.20 A). Auch in tumortragenden Mäusen (Tag 14) konnte keine verstärkte Aktivierung der DCs im Blut und in den Lymphknoten gezeigt werden (Abb. 4.20 B). Dennoch könnten endogene TLR-Liganden die DCs durch eine direkte Stimulation von Oberflächen-TLRs oder anderen endosomalen TLRs aktivieren. Die Stimulation von bmDCs mit Liganden für TLR1, TLR2, TLR4 (Oberfläche) und TLR13 (Endosomen) führte zur verstärkten Sekretion von IL-12, IL-6 und KC. Obwohl die TLR-defiziente bmDCs teilweise etwas mehr Zytokine sezernierten, waren die Unterschiede nicht signifikant. Im Falle von IL-12 war die Sekretion nicht verändert.

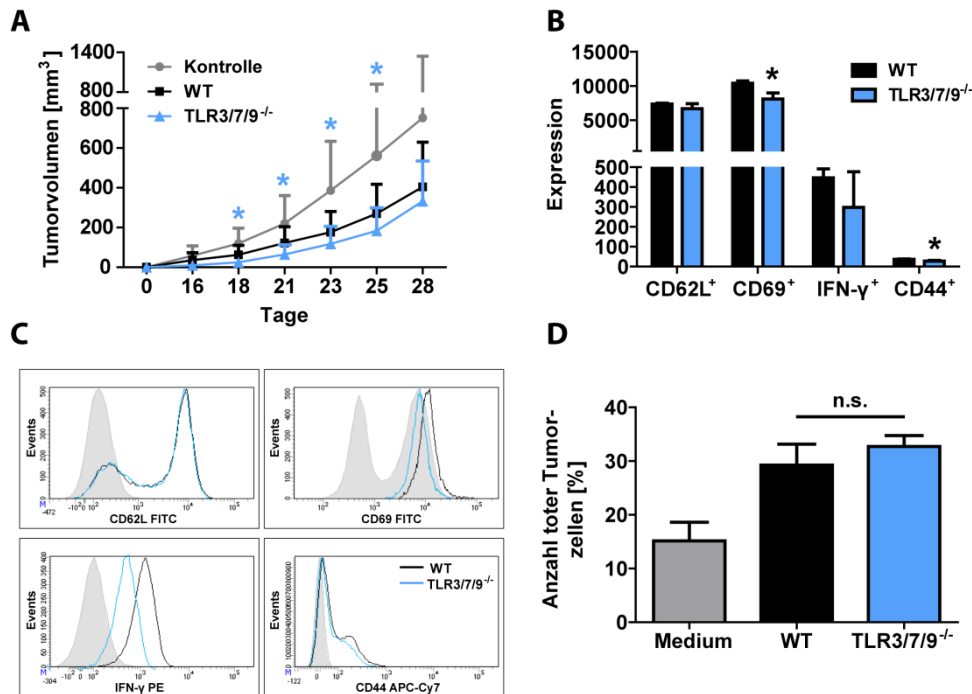


**Abb. 4.20: Keine systemische Hyperaktivierung von DCs in naiven und tumortragenden TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) bmDCs wurden aus dem Knochenmark von naiven WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> *ex vivo* generiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von MHC-II, CD80 und CD86 untersucht. Entsprechende Isotypkontrollen wurden verwendet und der delta Median berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert + SD. (B) Aus tumortragenden Mäusen (Tag 14) wurde Blut und die Lymphknoten entnommen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von MHC-II, CD80 und CD86 auf DCs untersucht. Dargestellt ist die mittlere Expression + SEM als delta Median (n=3). (C) bmDCs wurden wie in (A) generiert und mit Liganden für TLR2, TLR1/2, TLR4 und TLR13 für 18 h stimuliert. Der Überstand wurde abgenommen und die Sekretion von IL-12p70, IL-6 und KC mittels ELISA untersucht (n=4-5). Dargestellt ist der Mittelwert + SEM. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  erreicht (Student's t-Test).

Zusammenfassend widerlegen die Versuche die Hypothese von hyperaktivierten DCs in den TLR-defizienten Mäusen. Demnach müsste es in den WT und in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen gleichermaßen zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems kommen. Dagegen sprechen sowohl die verdickten Lymphknoten als auch die Abstoßung des Tumors. Dies deutet auf Unterschiede in den Effektorzellen des adaptiven Immunsystems hin. Die erhöhte Konzentration von IFN- $\gamma$  in den Tumoren (siehe Abb. 4.13) und die Abstoßung nach etwa zwei Wochen (siehe Abb. 4.1), lässt auf eine T-Zell vermittelte Reaktion schließen.

Daher wurden WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> T-Zellen aus tumortragenden Spendermäusen isoliert und diese in T-Zell-defiziente Nacktmäuse transferiert. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgte die s.c. Injektion von Tumorzellen. Die T-Zellen aus WT und TLR-defizienten Mäusen konnten das Tumorstadium in den Nacktmäusen im Vergleich zu der Gruppe ohne T-Zellen verringern (Abb. 4.21 A). Dieser Unterschied war nach Injektion von TLR3/7/9<sup>-/-</sup> T-Zellen sogar signifikant. Allerdings unterschied sich das Tumorstadium kaum, zwischen Mäusen die WT T-Zellen erhielten gegenüber Mäusen die TLR-defiziente T-Zellen erhielten. Dies

bestätigt die Ergebnisse der Chimärenversuche und zeigt, dass TLR-defiziente Immunzellen nicht ausreichen, um die Tumorabstoßung auszulösen.



**Abb. 4.21: Keine systemische Hyperaktivierung von T-Zellen in tumortragenden TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Milzzellen wurden aus Spendermäusen isoliert und T-Zellen durch B-Zell-Depletion aufgereinigt.  $2 \times 10^6$  WT oder TLR-defiziente T-Zellen wurden i.v. in Nacktmäuse (nu/nu) injiziert. Anschließend erfolgte die s.c. Injektion von  $2 \times 10^5$  MOPC Zellen. Die Tumore wurden alle 2-3 Tage gemessen und das Volumen berechnet. Als Kontrolle dienten Nacktmäuse, die keine T-Zellen erhalten hatten (n=4-5). Dargestellt ist der Mittelwert + SD. (B) Milzzellen tumortragender WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse (Tag 10) wurde durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von CD62L, CD69, IFN-γ und CD44 untersucht (n=3). Die Expression wurde als Median (CD62L, CD69) bzw. delta Median (IFN-γ, CD44) aufgetragen. Dargestellt ist der Mittelwert + SD. Repräsentative Beispiele für die Expression sind als Histogramm in (C) dargestellt. (D) Zytotoxizitäts-Assay mit Tumorzellen. Aus tumortragenden WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen wurden aus Milzzellen T-Zellen über negative Selektion mit dem Pan T Isolation Kit aufgereinigt. Die T-Zellen wurden über Nacht zusammen mit MOPC<sup>GFP</sup> Zellen in einem 1:1 Verhältnis inkubiert, welche einen Tag zuvor ausgesät wurden. Die Anzahl toter Tumorzellen wurde mit einer 7-AAD/Annexin-V Kit bestimmt. Tote Zellen, die 7-AAD und/oder Annexin-V positiv waren, wurden in Prozent zur Gesamtumorzellzahl berechnet. Als Kontrolle dienten MOPC Zellen ohne T-Zellen (n=3). Dargestellt ist der Mittelwert + SD. Für die statistische Analyse wurde der Student's t-Test verwendet.

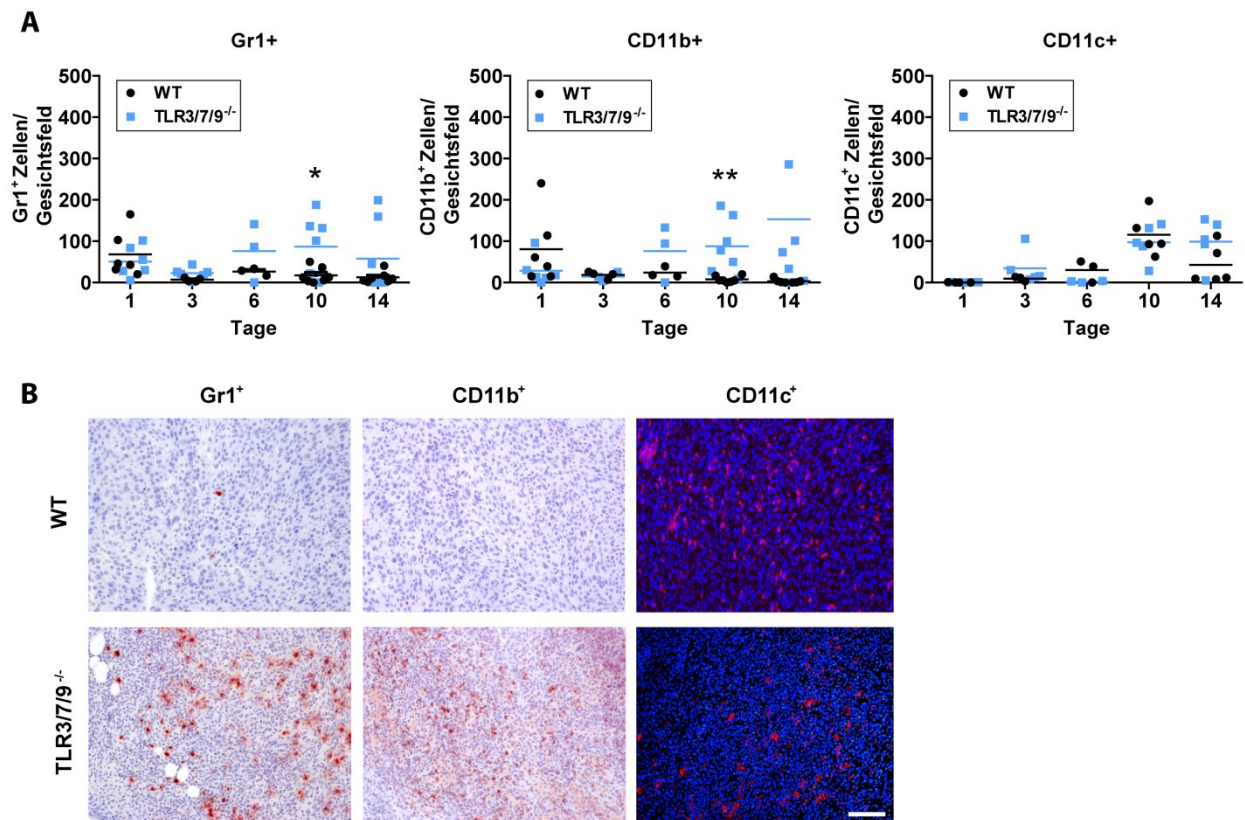
Um den Aktivierungsstatus und die Zytotoxizität der T-Zellen zu überprüfen, wurden Milzzellen aus tumortragenden Mäusen (Tag 10) isoliert. Die Aktivierung der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht, indem die Expression von L-Selektin (CD62L), ein Rezeptor auf naiven T-Zellen, der für den Eintritt in die sekundären Lymphgewebe notwendig ist, und die Aktivierungsmarker CD69, CD44 und IFN-γ verglichen wurde. Während die Expression von CD62L in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> T-Zellen nicht verändert war,

zeigten die TLR-defizienten T-Zellen überraschenderweise eine verringerte Expression aller drei Aktivierungsmarker (Abb. 4.21 B, C). Die Zytotoxizität wurde durch einen Zytotoxizitäts-Assay untersucht, in dem aufgereinigte T-Zellen aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Milzen mit MOPC<sup>-</sup> Zellen kokultiviert wurden. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl getöteter Tumorzellen: WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> T-Zellen verdoppelten beide die Anzahl toter Tumorzellen im Vergleich zu der Kontrolle ohne T-Zellen (Abb. 4.21 D). Dieser Befund zeigt, dass systemisch keine Unterschiede zwischen WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen in der Aktivierung und Zytotoxizität von T-Zellen vorliegen und bestätigt somit das Ergebnis des Nacktmausversuchs. Demnach muss es zu einer lokalen Veränderung der Immunzellen in dem Tumormikromilieu kommen.

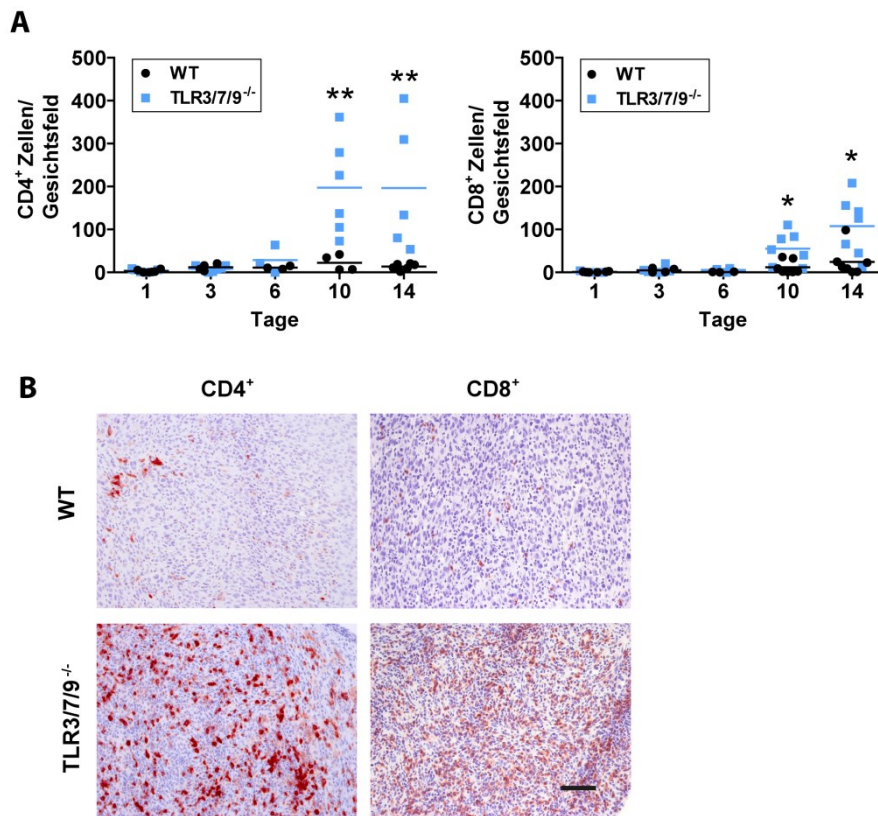
### **4.2.5 Deutlich verstärkte Immunzellinfiltration in Tumoren aus TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen**

Um die Immunzellinfiltration lokal im Tumor zu überprüfen, wurden Gefrierschnitte von Tumoren an verschiedenen Tagen nach der Tumorzellinjektion (Tag 1, Tag 3, Tag 6, Tag 10 und Tag 14) immunhistochemisch gefärbt und die positiven Zellen quantifiziert. Es wurde die Infiltration mit Monozyten/Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>), Granulozyten (Gr1<sup>+</sup>) und DCs (CD11c<sup>+</sup>) (Abb. 4.22) sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert (Abb. 4.23). Ein Tag nach der Injektion zeigte sich in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen eine akute Entzündungsreaktion durch die Infiltration mit CD11b<sup>+</sup> und Gr1<sup>+</sup> Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), welche zwei Tage später bereits abgeklungen war (Abb. 4.22 A). Interessanterweise kam es in den Tumoren der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse zwischen Tag 6 und Tag 10 zu einer massiven Infiltration mit allen untersuchten Immunzellen, während in den Tumoren der WT Mäuse nur eine sehr geringe Anzahl an Immunzellen zu finden war (Abb. 4.22-23). Die Ausnahme bildeten die DCs, die in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen gleichermaßen den Tumor infiltrierte (Abb. 4.22 A). Am deutlichsten stach die starke T-Zell-Infiltration der Tumore in den TLR-defizienten Mäusen heraus, die an Tag 10 und Tag 14 auftrat und somit genau in den Zeitraum der Tumorabstoßung fiel (Abb. 4.23).

Durch Dreifachfärbungen konnte gezeigt werden, dass sich in den Tumoren der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse nicht nur mehr T-Zellen, sondern auch mehr zytotoxische Zellen befanden (Abb. 4.24 A, B). Granzyme B wird von zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und manchmal von CD4<sup>+</sup> Zellen exprimiert. In den Tumoren der TLR-defizienten Mäuse waren deutlich mehr Granzyme B<sup>+</sup> Zellen zu finden (Abb. 4.24 A, B). Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen war nicht verändert (Abb. 4.24 C), was gegen einen verstärkten immunsuppressiven Effekt in den WT Mäusen spricht.

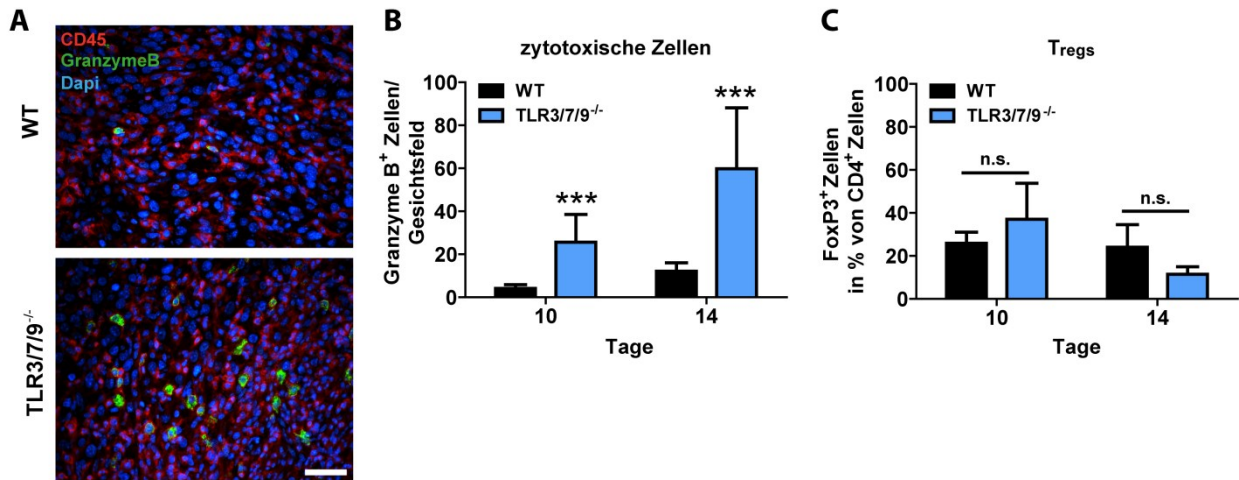


**Abb. 4.22: Verstärkte Infiltration von Antigen-präsentierenden Zellen in Tumoren aus TLR-defizienten Mäusen.** (A) Gefrierschnitte von Tumoren (Tag 1- Tag 14) aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen wurden immunhistochemisch hinsichtlich CD11b<sup>+</sup> und Gr1<sup>+</sup> Immunzellen untersucht. CD11c<sup>+</sup> Immunzellen wurden fluoreszenzhistochemisch untersucht. Die Quantifizierung erfolgte anhand von vier repräsentativen Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  erreicht (Student's t-Test). (B) Repräsentative Beispiele für die Färbungen an Tag 14 bei 200-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 4.23: Starke Tumorerinfiltration mit T-Zellen in TLR-defizienten Mäusen.** (A) Die Infiltration mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Immunzellen wurde immunhistochemisch in Gefrierschnitte von Tumoren (Tag 1- Tag 14) aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Die Quantifizierung erfolgte anhand von vier repräsentativen Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung. Statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  erreicht (Student's t-Test). (B) Repräsentative Beispiele für die Färbungen an Tag 14 bei 200-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

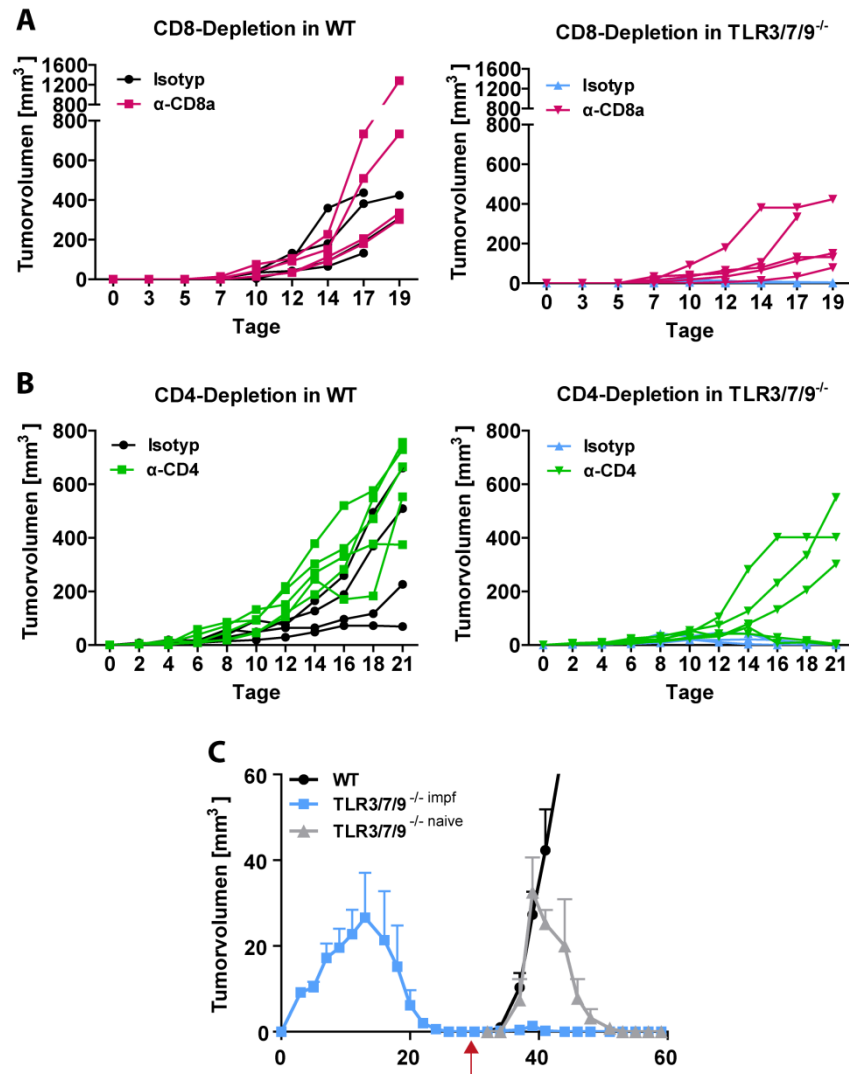




**Abb. 4.24: Erhöhte Anzahl zytotoxischer Zellen in Tumoren aus TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A, B) Gefrierschnitte von Tumoren an Tag 10 und Tag 14 wurden fluoreszenzhistochemisch hinsichtlich infiltrierender, zytotoxischer Immunzellen untersucht. (A) Dreifachfärbung mit Granzyme B (grün), CD45 (rot) und Dapi (blau) an Tag 10. Je ein repräsentatives Beispiel ist dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm. (B) Quantifizierung von Granzyme B<sup>+</sup> Zellen durch Auszählen von vier Gesichtsfeldern mit einer hohen Anzahl von CD45<sup>+</sup> Zellen bei 200-facher Vergrößerung. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM. (C) Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>): FoxP3<sup>+</sup> Zellen in Prozent zu CD4<sup>+</sup> Zellen in derselben Tumorregion. Die Auszählung erfolgte von vier Gesichtsfeldern mit einer hohen Anzahl von CD4<sup>+</sup> Zellen bei 200-facher Vergrößerung. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM. Statistische Signifikanz wurde mit p<0,05 erreicht (Student's t-Test).

#### 4.2.6 T-Zellen sind verantwortlich für die Tumorabstoßung

Da die vorherigen Ergebnisse auf eine T-Zell- vermittelte Abstoßungsreaktion hinweisen, wurde die Rolle der T-Zellen durch funktionelle Experimente überprüft. TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse und WT Mäuse wurden vor und nach der Tumorzellinjektion mit CD8-Depletionsantikörpern behandelt und die Depletion wurde regelmäßig im Blut überprüft. Während sich das Tumorwachstum in den WT Tieren ohne CD8<sup>+</sup> Zellen von den Kontrolltieren kaum unterschied, verhinderte die CD8-Depletion die Tumorabstoßung in allen fünf TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 4.25 A). Dies beweist, dass CD8<sup>+</sup> Zellen essentiell für die Abstoßung der Tumore sind. Ob auch CD4<sup>+</sup> Zellen solch einen Effekt haben, sollte die Verwendung von CD4-Depletionsantikörpern zeigen. Auch in diesem Fall wurde das Tumorwachstum in den WT Mäusen nicht verändert, während in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen 3 von 5 Tieren einen Tumor ausbildeten (Abb. 4.25 B). Demnach sind CD4<sup>+</sup> Zellen ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Tumorabstoßung, auch wenn die CD8<sup>+</sup> Zellen effektiver zu sein scheinen.



**Abb. 4.25: T-Zell-abhängige Tumorabstoßung in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) WT (n=4) und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> (n=5) Mäuse wurden mit 100 µg CD8a-Depletionsantikörper i.p. behandelt. Die erste Injektion erfolgte drei Tage vor der s.c. Injektion von MOPC<sup>-</sup> Tumorzellen und die zweite Injektion am Tag der Tumordinjektion. Anschließend erfolgte die Injektion wöchentlich. Die Kontrolltiere erhielten jeweils den entsprechenden Isotyp-Antikörper (n=5). Das Tumorstadium wurde alle 2-3 Tage bestimmt. (B) Die Depletion von CD4<sup>+</sup> Zellen in WT (n=5) und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen (n=5) erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die CD8-Depletion in (A). Die Kontrolltiere erhielten den entsprechenden Isotyp-Antikörper (n=3-4). (C) MOPC<sup>-</sup> Zellen wurden s.c. in die rechte Flanke von TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert (n=5). Nachdem in allen Tieren kein Tumor mehr sichtbar war, wurden in die kontralaterale Flanke s.c. erneut MOPC<sup>-</sup> Zellen injiziert (TLR3/7/9<sup>-/-</sup> impf, blau). Als Kontrolle dienten naive TLR-defiziente Mäuse (TLR3/7/9<sup>-/-</sup> naive, grau) (n=5) und naive WT Mäuse (n=3). Das Tumorstadium wurde alle 2-3 Tage bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM.

Wenn es sich bei der Tumorabstoßung um eine klassische T-Zell-Reaktion handelt, müssten die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse Gedächtnis-T-Zellen ausbilden, die sie wie bei einer Impfung vor einer erneuten Infektion schützen. Daher wurden TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen MOPC<sup>-</sup> Zellen



subkutan in die rechte Flanke injiziert (blau), wodurch sie dort einen kleinen Tumor entwickelten, den sie innerhalb von 20 Tagen abstießen (Abb. 4.25 C). Diesen Mäusen wurde nun in die andere Flanke wieder MOPC-Zellen injiziert (roter Pfeil). Als Kontrolle wurden naiven TLR-defizienten Mäusen (grau) und WT Mäusen (schwarz) ebenfalls s.c. Tumorzellen injiziert. Wie zu erwarten war, bildeten die zuvor „geimpften“ Mäuse keinen Tumor mehr aus, während die naiven TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse wie bisher einen Tumor entwickelten, den sie dann wieder abstießen. Die WT Mäuse entwickelten in dem gleichen Zeitraum deutlich größere Tumore. Dieser Versuch zeigt, dass die TLR-defizienten Mäuse Gedächtnis-T-Zellen entwickeln, was die These der T-Zell-abhängigen Abstoßung untermauert.

### 5 Diskussion

In Vorarbeiten wurde ermittelt, dass es in TLR3/7/9-defizienten Mäusen zu einer Abstoßung transplanterter Tumore kommt. In dieser Arbeit wurde daher der zugrundeliegende Mechanismus näher untersucht. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

#### 1) Welche TLR-Rezeptoren und -Signalwege sind betroffen?

Die Tumorabstoßung tritt nur auf, wenn TLR3, TLR7 und TLR9 fehlen. TLR-Einzel- und TLR-Doppel-KO Mäuse zeigten keine vergleichbare Reaktion. Durch den zusätzlichen Knockout von TLR2/4 in den TLR-Fünffach-KO Mäusen konnte die Tumorabstoßung größtenteils aufgehoben werden. Durch das Fehlen der Adapterproteine MyD88 und Trif konnten Tumore ebenfalls abgestoßen werden.

➔ Es ergibt sich daher eine gegensätzliche Wirkung von endosomalen TLR3/7/9 versus TLR2/4 auf der Zelloberfläche

#### 2) Ist das hämatopoetische oder das nicht-hämatopoetische Stroma wichtig für die Abstoßung?

Experimente mit Mauschimären zeigten, dass sowohl das hämatopoetische als auch das nicht-hämatopoetische Tumorstroma essentiell für die Abstoßungsreaktion ist. Der adoptive Transfer von Immunzellen zeigte zudem, dass diese nur zu dem Tumor rekrutiert werden, wenn sowohl das nicht-hämatopoetische Stroma als auch die transferierten Immunzellen TLR-defizient sind.

➔ Durch die Kooperation beider Kompartimente kommt es zur Tumorregression

#### 3) Vermitteln Zellen der angeborenen oder adaptiven Immunität die Abstoßungsreaktion?

Obwohl die Tumoren der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität infiltriert wurden, konnte durch die Verwendung von Depletionsantikörpern *in vivo* gezeigt werden, dass für die Tumorabstoßung sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen notwendig sind. Zudem bildeten die Mäuse eine Gedächtnisantwort aus.

➔ Es kommt zu einer T-Zell-abhängige Tumorabstoßung

Die Ergebnisse zeigen, dass es in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen durch den Einfluss des nicht-hämatopoetischen Stromas und dem lokalen Immunzellinfiltrat zu einer T-Zell-abhängigen Tumorabstoßung kommt. Dadurch ergeben sich einige Fragen, die im Folgenden diskutiert werden sollen:

- a) Wie können sich die verschiedenen TLR-Signalwege gegenseitig beeinflussen?
- b) Wie können das nicht-hämatopoetische und das hämatopoetische Stroma zu der Tumorabstoßung beitragen?
- c) Welche Rolle spielt die TLR-Expression in der Tumormikroumgebung?
- d) Wodurch wird die Tumorabstoßung induziert?
- e) Wie können die zum Teil kontroversen Befunde in den verschiedenen Knockout-Mausstämmen erklärt werden?

### 5.1 Endosomale TLRs haben einen pro-tumoralen Effekt

Während endosomalen TLRs bisher eine anti-tumorale Wirkung zugeschrieben wurde, konnte in dieser Arbeit eine Tumorabstoßung durch das Fehlen dieser Rezeptoren (*loss-of-function*) gezeigt werden: WT Mäuse konnten die Tumorprogression von Kopf-Hals-Tumorzellen, Blasen- und Lungenkarzinomzellen nicht verhindern, wohingegen die dreifach-defizienten TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse diese Tumore abstießen. Dadurch lässt sich auf einen pro-tumoralen Effekt endosomaler TLRs in der WT-Situation beziehungsweise auf die Ermöglichung einer anti-tumoralen Immunreaktion in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen schließen.

Bisher wurden die endosomalen TLRs hauptsächlich durch Stimulation mit ihren Liganden oder durch Einzel-KO Mäuse untersucht. Daher gibt es nur wenige Erkenntnisse über das Zusammenwirken der verschiedenen TLRs. Die Experimente mit Einzel- und Doppel-TLR KO Mäusen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass nicht ein einzelner oder zwei TLRs für die Tumorabstoßung in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen verantwortlich sind, sondern dass eine Kombination aller drei TLRs notwendig ist. Da die endosomalen TLRs nach heutigem Kenntnisstand die einzigen TLRs sind, die Nukleinsäuren erkennen können, scheint eine Inhibierung dieses Signalweges für die Tumorabstoßung verantwortlich zu sein. Dabei muss bedacht werden, dass die endosomalen Rezeptoren TLR8 und TLR11 bis TLR13 nicht ausgeschaltet wurden. Im Gegensatz zu TLR3, TLR7 und TLR9, sind für TLR13 bisher keine endogenen Liganden bekannt (Yu *et al.*, 2012a). Die Gruppe von C. Kirschning konnte zeigen, dass TLR13 eine konservierte 23S ribosomale RNA Sequenz von Bakterien bindet (Oldenburg *et al.*, 2012). Zudem erkennt er Bestandteile eines Stomatitis-Virus (Shi *et al.*, 2011). Auch für TLR11 und TLR12 sind keine endogenen Liganden beschrieben. TLR8 ist in den Mäusen vorhanden, aber im Gegensatz zu dem humanen TLR8 vermutlich funktionslos (Jurk *et al.*, 2002). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse keine endogenen Nukleinsäuren erkennen können.

#### 5.1.1 Zusammenwirken von zwei Signalwegen: MyD88 und Trif

TLRs können ihr Signal entweder über die Adaptermoleküle MyD88 oder Trif in die Zelle weiterleiten, mit der Ausnahme von TLR4, der mit beiden Molekülen interagieren kann. Interessanterweise ähnelte das Tumorwachstum in der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MyD88/Trif<sup>-/-</sup> Mäusen dem in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Tieren: Die Hälfte der Doppel-KO Mäuse konnten den Tumor abstoßen und die restlichen Tiere entwickelten nur sehr kleine Tumore. Im Gegensatz dazu bildeten alle MyD88<sup>-/-</sup> und Trif<sup>-/-</sup> Einzel-KO Mäusen einen Tumor aus.

Der Einfluss von Trif auf das Tumorwachstum ist in der Literatur kaum beschrieben, wohingegen der MyD88-abhängige Signalweg in diesem Kontext gut untersucht ist. Das liegt vermutlich daran, dass er von allen TLRs mit Ausnahme von TLR3 verwendet wird (Kawai and Akira, 2010). Während in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass die TLR/MyD88-abhängige Aktivierung von Immunzellen für die Eliminierung verschiedener Erreger wichtig ist (Egan *et al.*, 2009; Nagarajan *et al.*, 2011), wird die Rolle dieses Signalwegs in der Tumorentwicklung kontrovers diskutiert. In den Experimenten dieser Arbeit hatte das Fehlen von MyD88 keinen direkten Einfluss auf das Tumorwachstum der Kopf-Hals-Tumorzelllinie, da alle MyD88<sup>-/-</sup> Mäuse Tumore entwickelten, die nach einem Monat mit der WT-Situation vergleichbare Größen erreichten. Im Gegensatz dazu wuchsen die Tumore in den Trif<sup>-/-</sup> Mäusen nur sehr langsam. Dies könnte bedeuten, dass die Tumorregression in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen durch die fehlende Aktivierung des Trif-abhängigen Signalweges hervorgerufen wurde.

In der Literatur werden sowohl pro- als auch anti-tumorale Effekte von MyD88 beschrieben. Während in einer Melanomtherapiestudie die HMGB1/MyD88-abhängige Aktivierung von Makrophagen und DCs das Tumorwachstum reduzierte (Werthmüller *et al.*, 2015), konnten Hong und Kollegen zeigen, dass in MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen die immunsuppressive Funktion von MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) inhibiert war, wodurch sie ihre Fähigkeit verloren die antigen-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu unterdrücken (Hong *et al.*, 2012). Die meisten Daten, die einen tumorfördernden Effekt von MyD88 zeigten, wurden durch die Untersuchung von chemisch-induzierten Tumoren erhoben. Durch die im Rahmen dieser Modelle verwendeten Substanzen, wird eine chronische Entzündungsreaktion hervorgerufen, welche zur Ausbildung von gut- und bösartigen Tumoren führt (Salcedo *et al.*, 2013). Swann und Kollegen führen den pro-tumoralen Effekt von MyD88 auf einen modulatorischen Effekt des Immunsystems zurück (*Immunoediting*). Sie konnten zeigen, dass MyD88<sup>-/-</sup> Mäuse deutlich weniger 7,12-Dimethylbenzo[a]anthracen/Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierte Hautpapillome und weniger 3-Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkome ausbildeten (Swann *et al.*, 2008). Im Pankreaskarzinom wird der pro-inflammatorische und pro-tumorale Effekt der MyD88-Inhibition durch DCs vermittelt, die eine T<sub>H</sub>2-Typ Antwort induzieren (Ochi *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu spielt MyD88 keine Rolle bei der Kontrolle von akuten Immunreaktionen (*Immunosurveillance*), da subkutan injizierte EL4-OVA Tumorzellen in WT und MyD88 Mäusen gleichermaßen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen angegriffen wurden (Swann *et al.*, 2008). Da in dieser Arbeit ebenfalls ein Tumortransplantationsmodell verwendet wurde, kann das ähnliche Tumorwachstum in WT und MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen durch eine unveränderte Reaktion des adaptiven Immunsystems

zurückzuführen sein. Ein wie zuvor beschriebener anti-tumoraler Effekt von HMGB1 scheint in den MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen aufgrund der ähnlichen Tumorgröße keine Rolle zu spielen, könnte aber einen Effekt auf das Tumorwachstum in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen haben (siehe Kapitel 5.3). Aus dem reduzierten Tumorwachstum in den Trif<sup>-/-</sup> Mäusen lässt sich ein pro-tumoraler Effekt dieses Signalwegs in der WT-Situation ableiten. Übereinstimmend mit diesen Daten waren Trif<sup>-/-</sup> Mäuse vor chemisch induzierter Pankreatitis geschützt (Ochi *et al.*, 2012). Interessanterweise konnten Seregin und Kollegen zeigen, dass Trif ein negativer Regulator für die DC-Aktivierung *in vivo* ist. Die Stimulation von DCs mit dem rEA Adjuvans, ein Antigen von *Eimeria tenella*, induzierte über den MyD88-Signalweg die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, die durch Trif blockiert wurde. Während in Trif<sup>-/-</sup> Mäusen die Produktion von IL-12 und die Induktion von ko-stimulatorischen Molekülen durch DCs, sowie die Produktion von IFN-γ durch NK-Zellen erhöht war, war die Aktivierung der Immunzellen in den MyD88<sup>-/-</sup> im Vergleich zu der WT-Situation deutlich reduziert (Seregin *et al.*, 2011). Dies könnte das verminderte Tumorwachstum in den Trif<sup>-/-</sup> Mäusen dieser Arbeit erklären. Durch die fehlende Inhibierung der Zytokinausschüttung in den Trif<sup>-/-</sup> Mäusen käme es zu einer verstärkten Aktivierung von Immunzellen, die dadurch die Tumoren effizienter angreifen könnten. Die Aktivierung der Immunzellen in den Trif<sup>-/-</sup> Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht direkt untersucht. Die Analysen in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> hatten jedoch keinen Hinweis auf eine systemische Immunzellaktivierung gegeben. Allerdings könnte es zu einer lokalen Stimulation der Zellen in der Tumormikroumgebung kommen, die im Falle der Trif<sup>-/-</sup> und möglicherweise der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse deutlich stärker ausfiele, während die Aktivierung in WT und MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen durch Trif blockiert würde.

### 5.1.2 Entgegengesetzte Effekte von TLR3/7/9 und TLR2/4

In der Literatur gelten endosomale TLRs als anti-tumoral und die Aktivierung von TLR2/4 als pro-tumoral (Pradere *et al.*, 2014). Überraschenderweise verstärkte das zusätzliche Fehlen von TLR2 und TLR4 in TLR2/3/4/7/9-Fünffach-KO Mäusen in dem untersuchten Tumormodell nicht die Abstoßungsreaktion. Hingegen konnte ein sehr heterogenes Tumorwachstum beobachtet werden, was darauf hinweist, dass sich die TLRs gegenseitig beeinflussen können. In TLR2/4<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup> Mäusen war das Tumorwachstum vergleichbar mit dem Wachstum in den WT Tieren.

In der WT-Situation scheint es durch die endogene Stimulation pro- und anti-tumoraler TLRs zu entgegengesetzten Signalen zu kommen, die letztlich zugunsten der pro-tumoralen

endosomalen TLRs ausfällt, wodurch es zum Tumorwachstum kommt. Durch die fehlenden pro-tumoralen Signale könnte dementsprechend in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen ein TLR2/4-abhängiger anti-tumoraler Mechanismus operativ sein. Um diese Mechanismen genauer zu untersuchen, könnte durch die Verwendung von Chloroquin in WT und TLR-Fünffach-KO Mäusen die endosomalen TLR-Signale blockiert werden. Chloroquin wirkt gegen Malaria, wird aber auch zur Untersuchung endosomaler Prozesse verwendet, da es den sauren pH-Wert in Endosomen neutralisiert (Baiersdörfer *et al.*, 2010). Eine andere Möglichkeit wäre, den anti-tumoralen Mechanismus von TLR2 und TLR4 in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen zu verstärken. Dies könnte durch die Behandlung von TLR<sup>-/-</sup> Mäusen mit LPS untersucht werden.

### **5.2 Die Interaktion verschiedener Kompartimente der Tumormikroumgebung**

In allen Geweben stehen Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt und durch die Sekretion von Molekülen und Vesikeln ständig miteinander in Verbindung und können sich gegenseitig beeinflussen. Auch Tumorzellen stehen im ständigen Kontakt mit ihrem Umfeld und können dadurch eine spezielle Mikroumgebung schaffen, die das Wachstum des Tumors begünstigt. Die verschiedenen Mechanismen wurden in der Einleitung in Kapitel 1.1 beschrieben. Unter anderem werden nicht-hämatopoetische Zellen und das Immunzellinfiltrat durch die pro-tumoralen Signale dahingehend verändert, dass sie selber tumorfördernde Stoffe sezernieren.

Durch die Generierung von Mauschimären konnte gezeigt werden, dass sowohl Immunzellen als auch nicht-hämatopoetische Zellen die Tumorprogression beeinflussen. Durch den TLR3/7/9-Knockout muss es demnach zu Veränderungen in beiden Kompartimenten des Tumorstromas kommen. Dies wurde durch histologische Färbungen der Tumore bestätigt. Es wurden deutliche Unterschiede in der Ausbildung der Gefäße und eine enorme Infiltration mit verschiedenen Immunzellen deutlich. Der Transfer von Milzzellen bestätigte, dass die starke Immunzellrekrutierung nur in Mäusen auftritt, die in beiden Kompartimenten einen TLR-Defekt aufweisen. Expressieren entweder nicht-hämatopoetische oder hämatopoetische Zellen endosomale TLRs kommt es, wie in der WT-Situation, zu keiner Rekrutierung der Immunzellen. Dies spricht für einen sehr komplexen Prozess, der zwischen verschiedenen Zelltypen in den Tumoren der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse abläuft. Im Folgenden soll analysiert werden, wie die verschiedenen Zellkompartimente und die TLR-Signalwege die komplexen Abläufe im Tumor beeinflussen können.

### 5.2.1 Wie beeinflusst die TLR-Expression der malignen Zellen das Tumorstadium?

Mittlerweile ist bekannt, dass sehr viele Tumorzellen TLRs exprimieren können (Huang *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2009). Auch die verwendete Kopf-Hals-Tumorzelllinie MOPC exprimiert TLRs (Klein *et al.*, 2016). Die Stimulation von TLRs auf Tumorzellen führt zu einer verstärkten Aktivierung von NF- $\kappa$ B (s.u.) und zur Produktion von anti-apoptotischen Proteinen, wodurch die Tumorzellproliferation gefördert wird. Zudem kann es zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen kommen, was zur Rekrutierung von Immunzellen führt. Diese Immunzellen sezernieren weitere entzündungsfördernde Zytokine, Wachstumsfaktoren und Angiogenese-fördernde Substanzen, wodurch die anti-tumorale Funktion von APCs und T-Zellen beeinträchtigt wird (Sato *et al.*, 2009).

Die Ähnlichkeit zwischen Entzündungen und Tumoren wurde bereits in der Einleitung erläutert. NF- $\kappa$ B stellt eine Verbindung zwischen diesen beiden Ereignissen dar. Die Aktivierung der TLRs führt sowohl über den MyD88- als auch über den Trif-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktion und Apoptose spielt und somit auch die Entstehung von Tumoren beeinflussen kann (Pikarsky *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2013b). NF- $\kappa$ B kontrolliert die Expression von anti-apoptotischen Genen und begrenzt die Aktivierung von pro-apoptotischen Signalwegen (Dutta *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1998). Zudem führt die TLR-Stimulation zur verstärkten Sekretion von tumorfördernden Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , welche ihrerseits NF- $\kappa$ B aktivieren.

In dem untersuchten Tumormodell werden TLR-exprimierende MOPC Zellen in WT und TLR-defiziente Mäuse injiziert. Demnach kann in beiden Stämmen eine direkte Aktivierung der Tumorzellen durch TLR-Liganden stattfinden. Es kann jedoch durch eine veränderte TLR-abhängige Stimulation der nicht-malignen Zellen der Tumormikroumgebung zu einem veränderten Feedback-Mechanismus durch die vom Tumor sezernierten Substanzen in den beiden Mausstämmen kommen. So können tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) oder tumor-infiltrierenden Fibroblasten (CAFs) das Tumorstadium fördern, indem sie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sezernieren (Pradere *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass Hitzeschockproteine (HSPs) von Tumorzellen ausgeschüttet werden, die zur Aktivierung von TLR4 auf TAMs führten, wodurch die TAMs wiederum NF- $\kappa$ B in den Tumorzellen aktivierten und Tumorstadium förderten (Lee *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Mechanismus könnte in den WT Mäusen durch die Aktivierung endosomaler TLRs durch endogene Nukleinsäuren ablaufen (siehe Kapitel 5.3).



Die Gruppe von Michael Karin fand heraus, dass die Stimulation von Tumorzellen mit LPS zu einer verstärkten Metastasierung führte. Dieser Prozess war von der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Tumorzellen abhängig, aber auch von der TNF- $\alpha$  Produktion durch hämatopoetische Zellen (Luo *et al.*, 2004). Dies macht die wichtige unterstützende Funktion der Mikroumgebung deutlich. Zudem beobachteten die Wissenschaftler, dass die Inhibierung von NF- $\kappa$ B in Darm- und Brusttumorzellen zu einer LPS-induzierten Tumorregression führte. Die Stimulation hatte also einen entgegengesetzten Effekt: induzierte LPS normalerweise die Proliferation der Tumorzellen, führte die Stimulation nach der Inhibition von NF- $\kappa$ B zur Apoptose (Luo *et al.*, 2004).

Könnte es also sein, dass es durch die fehlenden endosomalen TLR-Signale in den Zellen der Tumormikroumgebung zu einer reduzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Tumorzellen kommt, wodurch Signale über TLRs auf der Zelloberfläche eine entgegengesetzte Wirkung haben? Diese Frage ist mit den vorliegenden Daten schwer zu beantworten. Der Mikroarray hatte keine Hinweise auf eine unterschiedliche Expression von NF- $\kappa$ B geliefert, allerdings stammten die Proben auch von einem frühen Zeitpunkt (Tag 4 und Tag 6). Möglicherweise würde der Vergleich von Tumoren zum Zeitpunkt der Tumorabstoßung eine erhöhte Expression von NF- $\kappa$ B in den Tumoren der WT Mäuse offenlegen.

### **5.2.2 Wie können die TLR-defizienten Immunzellen zu der Tumorabstoßung beitragen?**

Ursprünglich wurde die Aktivierung endosomaler TLRs in Immunzellen ausschließlich mit einem anti-tumoralen Effekt in Verbindung gebracht, weswegen ihre Liganden als Hoffnung für die Immuntherapie gesehen wurden. In dieser Arbeit konnte jedoch eine anti-tumorale Immunreaktion in den TLR3/7/9-defizienten Mäuse gezeigt werden, die den geringen Therapieerfolg einiger Substanzen erklären könnte. Das Tumorummzellinfiltrat war in den TLR-defizienten Mäusen deutlich erhöht und in der Abstoßungsphase befanden sich vor allem eine große Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Tumoren. Zudem produzierten Tumore *ex vivo* erhöhte Mengen von IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-24 auf RNA- und Proteinebene. Durch Depletionsexperimente konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Abstoßungsreaktion verantwortlich sind. Vermutlich sind die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen die eigentlichen Angreifer der Tumorzellen, während die CD4<sup>+</sup> Zellen wichtige immunaktivierende Zytokine, wie IFN- $\gamma$  ausschütten und somit die CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimulieren. In den immunkompetenten WT Mäusen scheinen die Tumore jedoch vor den Angriffen durch die Effektorzellen geschützt zu sein.

Eine verstärkte Aktivierung von TLR-defizienten Immunzellen ist in der Literatur bisher kaum beschrieben. Jedoch konnte von Huang und Kollegen ein ähnlicher Effekt für TLR4 in einer Darmkrebszelllinie gezeigt werden. Die Blockade von TLR4 führte zur Ausbildung deutlich kleinerer Tumore. T-Zellen, die aus diesen Tumoren isoliert wurden, zeigten eine verstärkte Proliferation und die NK-Zellen sezernierten deutlich mehr IFN- $\gamma$ . *In vitro* führte die Behandlung von Tumorzellen mit LPS zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation und der NK-Zell-Toxizität. Zudem führte die TLR4-Aktivierung zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Angriffen durch zytotoxische T-Zellen (Huang *et al.*, 2005). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte keine erhöhte Zytotoxizität oder Aktivierung von TLR3/7/9<sup>-/-</sup> T-Zellen gezeigt werden. Allerdings wurden T-Zellen aus dem Blut oder der Milz der Mäuse verwendet. Die Isolation von T-Zellen aus den Tumoren war aufgrund der geringen Größe nicht möglich. Die erhöhte Anzahl an Granzyme B<sup>+</sup> Zellen im Tumor und die Anschwellung der drainierenden Lymphknoten sprechen allerdings für eine lokale Reaktion. Die vergleichbare Infiltration von DCs in Tumoren der WT und TLR-defizienten Mäusen legt nahe, dass keine unterschiedliche Aktivierung vorliegt. Zudem waren die DCs im Blut und den drainierenden Lymphknoten von tumortragenden Mäusen auf ähnliche Weise aktiviert. Die bisherigen Daten deuten auf eine lokale anti-tumorale Immunreaktion hin, die durch ein verändertes Tumormilieu erklärt werden kann. Wie dies von nicht-hämatopoetischen Stromazellen beeinflusst werden kann, soll im Folgenden erläutert werden.

### **5.2.3 Wie können nicht-hämatopoetische Stromazellen das Tumorwachstum beeinflussen?**

Die Chimärenversuche zeigten deutlich, dass auch die nicht-hämatopoetischen Zellen die Tumorprogression beeinflussen. Die transferierten TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Immunzellen konnten in den WT Mäusen das Tumorwachstum nicht verhindern, sodass die Chimären ein mit den WT Tieren vergleichbares Tumorwachstum zeigten. In diesem Fall scheinen die TLR-Signale in der Tumorumgebung die Rekrutierung oder Aktivierung der TLR-defizienten Immunzellen zu verhindern. Der adoptive Transfer markierter TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Milzzellen zeigte, weder eine Infiltration der Zellen in den Tumor, noch eine Akkumulation am Rand des Tumors. Dies kann nur durch geringere Rekrutierungssignale der WT-Tumormikroumgebung erklärt werden, da die gleichen Zellen in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen den Tumor infiltrierten. Doch wie können die nicht-hämatopoetischen Stromazellen die Rekrutierung von Immunzellen beeinflussen und welche Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Zelltypen sind bekannt?

Es wird angenommen, dass sich CAFs aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) entwickeln. Wurden humane MSCs aus dem Knochenmark für längere Zeit mit dem Überstand von humanen Brusttumorzellen stimuliert, entwickelten sie einen CAF-ähnlichen Phänotyp. Die Zellen exprimierten SDF-1 und die typische Myofibroblastenmarker  $\alpha$ -SMA und FSP (*fibroblast surface protein*). Zudem begünstigten sie Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* (Mishra *et al.*, 2008). Im Vergleich zu normalen Hautfibroblasten exprimierten frisch isolierte CAFs aus humanen Plattenepithelkarzinomen erhöhte Mengen IL-6, zudem war die Expression von CXCL-1, CYR61, COX-2 und IL-1 $\beta$  induziert (Erez *et al.*, 2010). Interessanterweise konnten diese Effekte durch Blockierung von NF- $\kappa$ B reduziert werden, was eine Verbindung zu den TLR-Signalwegen darstellt.

CAFs können einen großen Teil der Tumormikroumgebung darstellen und ihr pro-tumoraler Effekt konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, von denen einige Beispiele bereits in der Einleitung aufgeführt wurden (siehe Kapitel 1.1.1). Sie können das Tumorwachstum entweder direkt durch die Sekretion von Molekülen wie SDF-1 und CXCL-12 oder indirekt durch die Begünstigung von Angiogenese und die Generierung eines pro-tumoralen Mikromilieus fördern (Ohshio *et al.*, 2015; Orimo *et al.*, 2005). Letzteres geschieht durch die Ausschüttung von immunmodulatorischen Mediatoren, wodurch eine „Typ 2“-Immunantwort begünstigt wird. Während die Sekretion von IL-6 und SDF-1 durch CAFs zur M2-Polarisierung von Makrophagen führt, hat TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), ein IL-7 ähnliches Zytokin, einen immunmodulatorischen Effekt auf myeloide DCs, wodurch diese T<sub>H</sub>2-rekrutierende Chemokine ausschütten (Comito *et al.*, 2014; De Monte *et al.*, 2011). Zudem begünstigen sie die Infiltration von MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*) und T<sub>regs</sub>, wohingegen sie die Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen inhibieren (Liao *et al.*, 2009; Ohshio *et al.*, 2015).

Um den Einfluss von Fibroblasten auf das Tumorwachstum zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Fibroblasten aus der Haut von naiven Mäusen isoliert und *ex vivo* expandiert. Während der Sphäroidassay *in vitro* eine verringerte Adhäsionsfähigkeit der TLR-defizienten Fibroblasten vermuten ließ, zeigte sich in dem Koinjektionsexperiment *in vivo* kein Unterschied im Tumorwachstum. Tumorzellen, die zusammen mit WT oder TLR-defizienten Fibroblasten injiziert wurden, zeigten weder in den WT Mäusen noch in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen ein abweichendes Wachstum im Vergleich zu Tumorzellen, die ohne Fibroblasten injiziert wurden. Daher lässt sich ein wesentlicher Einfluss von Hautfibroblasten auf die Abstoßungsreaktion ausschließen. Bei der Interpretation muss beachtet werden, dass in den Versuchen „normale“ Fibroblasten verwendet wurden, die zuvor noch keinen Stimulationen durch tumorale Faktoren ausgesetzt waren. Fibroblasten

aus gesundem Gewebe haben normalerweise keinen tumorfördernden Effekt, allerdings nahmen sie durch die Koinjektion mit Tumorzellen einen pro-tumoralen Phänotyp an (Erez *et al.*, 2010). Daher hätte ein deutlicher parakriner Effekt zwischen Tumorzellen und Fibroblasten auch in dem hier präsentierten Koinjektionsexperiment sichtbar werden können. Zusätzlich zu Fibroblasten besteht ein Tumor noch aus weiteren nicht-hämatopoetischen Zellen. Vor allem die Ausbildung von Gefäßen ist von entscheidender Bedeutung für die Tumorprogression.

### 5.2.4 Wie beeinflussen die unterschiedlichen Gefäße das Tumorwachstum?

Die Angiogenese ist ein essentieller Mechanismus in der Tumorentstehung, da die Gefäße die Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleisten und Abfallprodukte entsorgen (Nussenbaum and Herman, 2010). Angiogenese-induzierende Moleküle wie VEGF werden von Tumorzellen, Immunzellen und CAFs sezerniert. Jedoch weisen die tumorversorgende Gefäße häufig eine veränderte Struktur auf (Carmeliet, 2005). In dieser Arbeit konnte die Ausbildung von zwei unterschiedlichen Tumorgefäßtypen in WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen durch immunhistochemische Färbungen und 3D Lightsheet-Mikroskopie der Tumore gezeigt werden. In den Tumoren der immunkompetenten WT Mäuse bildete sich ein gleichmäßiges Gefäßsystem aus, welches aus vielen kleinen Kapillaren bestand und den Tumor gleichmäßig durchzog, mit Ausnahme von nekrotischen Bereichen in der Mitte größerer Tumore. Im Gegensatz dazu, entwickelten sich in Tumoren der TLR-defizienten Mäuse deutlich veränderte Gefäße. Sie hatten eine heterogene Struktur, waren erheblich größer und die kräftigere histologische Färbung ließ ein mehrschichtiges Endothel vermuten. Zudem war die Anzahl der Gefäße verringert und einige Bereiche des Tumors wurden nicht versorgt. Gefäße dieser Art kommen oft in Tumoren vor und sind aufgrund einer unterbrochenen Basalmembran häufig durchlässig (Ribeiro and Okamoto, 2015), wodurch die Extravasation von Immunzellen in den Tumor erleichtert wird.

Die spezielle Tumormikroumgebung scheint in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen dieses unorganisierte Wachstum hervorzurufen, da in anderen Geweben bisher keine abnormale Gefäßbildung beobachtet werden konnte und auch sechs Tage nach der Tumordinjektion noch keine Unterschiede in der Gefäßausbildung zu erkennen waren. Die veränderten Gefäße und die starke Immuninfiltration traten beide ab Tag 10 zum Beginn der Tumorabstoßungsphase auf und scheinen daher miteinander in Verbindung zu stehen. Diese Interaktion könnte über verschiedene Wege stattfinden. Entweder verändern sich die Gefäße durch eine Stimulation der Tumormikroumgebung und anschließend kommt es zu

der erhöhten Infiltration mit anti-tumoralen T-Zellen. Dies könnte, wie zuvor beschrieben, durch Signale anderer Komponenten des Stromas hervorgerufen werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass zytotoxische T-Zellen durch Chemokine in den Tumor rekrutiert werden und die Endothelzellen direkt schädigen, wodurch die Gefäße durchlässiger werden. Für die zweite Theorie spricht, dass in einer Studie von Chouaib und Kollegen Endothelzellen aus Melanomen durch spezifische CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen getötet wurden, da sie Peptide von Tumorzellen präsentierten. Diese wurden von den Melanomzellen über „Gap Junctions“ auf die Endothelzellen übertragen (Chouaib *et al.*, 2010). Auch indirekt könnten T-Zellen die Induktion von Apoptose der Endothelzellen durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  begünstigen, welches in erhöhten Mengen von Tumoren aus TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen sezerniert wurde. IFN- $\gamma$  hatte einen synergistischen Effekt auf TNF-induzierten Zelltod der Endothelzellen und die Behandlung von Melanompatienten mit hohen Mengen an TNF und IFN- $\gamma$  führte zur Apoptose des Gefäßendothels in den Metastasen (Lejeune *et al.*, 2006; Ruegg *et al.*, 1998). Die Menge von TNF wurde in den Versuchen dieser Arbeit nicht bestimmt. Es könnten aber erhöhte Mengen in den Tumoren der TLR-defizienten Mäuse vorhanden sein, da TNF von Makrophagen sezerniert werden kann, welche bereits sechs Tage nach der Tumordinjektion begannen die Tumore der TLR-defizienten Mäuse zu infiltrieren, was in den Tumoren der WT Mäuse nicht zu beobachten war.

Die Untersuchung von Perizyten zeigte ebenfalls Unterschiede zwischen Tumoren aus WT und TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen. Während Gefäße normalerweise von einer Schicht aus Perizyten umgeben werden, kann es in Tumoren von einer sehr hohen bis zu gar keiner Bedeckung mit Perizyten kommen (Ribeiro and Okamoto, 2015). Sie können durch die Expression verschiedener Moleküle charakterisiert werden:  $\alpha$ -SMA, Desmin, PDGFR $\beta$ , CD146 und NG2 Proteoglykan. Jedoch exprimieren nicht alle Perizyten jedes dieser Proteine (Elkabets *et al.*, 2010). Die histologische Untersuchung der Tumore aus WT und TLR-defizienten Mäusen zeigte, dass die Gefäße negativ für PDGFR $\beta$  waren und  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Perizyten befanden sich nur an großen Gefäßen im Bindegewebe am Rand der Tumore. Deutliche Unterschiede zeigten sich in der Anzahl Desmin<sup>+</sup> Perizyten. Überraschenderweise waren in den Tumoren der WT Mäuse nur wenige Gefäße von diesen Perizyten umgeben, die sich vor allem am Randbereich des Tumors befanden. Demnach scheinen sich in der WT-Situation Gefäße mit einer sehr dünnen Wand auszubilden. Im Gegensatz dazu sind eine Vielzahl von Gefäßen in den Tumoren der TLR-defizienten Mäuse von Desmin<sup>+</sup> Perizyten bedeckt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da Perizyten Gefäße stabilisieren, die Vasokonstriktion und Vasodilation der Kapillaren regulieren und zusätzlich eine Barriere für Immunzellen darstellen können.

Durch stabilere Gefäße kann der Tumor besser versorgt werden, wodurch das Tumorstadium begünstigt wird (Bergers and Song, 2005; Ribeiro and Okamoto, 2015). Eine Studie mit Melanom- und Nierenkarzinomzellen zeigte, dass eine erhöhte Anzahl an Perizyten den Therapieerfolg reduzierte (Gee *et al.*, 2003). Allerdings können Perizyten das Tumormilieu durch die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren beeinflussen (Ribeiro and Okamoto, 2015). Im zentralen Nervensystem übernehmen Perizyten sogar Eigenschaften von Immunzellen, wie Phagozytose und Antigenpräsentation und die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder LPS führte zur Sekretion von IL-8 und MMP9, wodurch die Rekrutierung und Transmigration von Neutrophilen begünstigt wurde (Balabanov *et al.*, 1996; Pieper *et al.*, 2013; Pieper *et al.*, 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das feine Gefäßnetzwerk in den WT Mäusen den Tumor vermutlich besser mit Nährstoffen versorgt und somit zur Tumorstadium beiträgt, während das heterogene Gefäßsystem der Tumoren in den TLR-defiziente Mäusen durch dysfunktionale, durchlässige Gefäße die Infiltration von Immunzellen begünstigt. Dieser Prozess könnte durch die Perizyten direkt oder indirekt verstärkt werden. Diese Überlegungen gehen von der Annahme aus, dass sich die Tumormikroumgebung bereits so stark verändert hat, dass dadurch entweder die Gefäße verändert werden oder die Infiltration mit Immunzellen gefördert wird.

### 5.3 Welche TLR-Liganden können zur Tumorstadium beitragen?

Eine wesentliche Frage ist, wodurch die Veränderungen in dem Tumormikromilieu induziert werden, die nach zwei Wochen zu der Abstoßungsreaktion in den TLR3/7/9-/- Mäusen führen. Die immunhistologischen Untersuchungen des Tumorummunzellinfiltrats hatten keine deutlichen Unterschiede in der frühen Phase des Tumorstadiums gezeigt und auch die Mikroarrayanalyse hatte keinen entscheidenden Hinweis auf einen anti-tumoralen Prozess vier und sechs Tage nach der Tumorzellinjektion geliefert. Das Tumorstadium in keimfreien Mäusen konnte zudem einen tumorfördernden Effekt der Mikrobiota in den WT Mäusen ausschließen. Demnach müssen endogen Moleküle die Abstoßungsreaktion induzieren, die von Zellen der Tumormikroumgebung freigesetzt werden. Eine Hauptquelle für diese Moleküle stellen die Tumorzellen selbst dar. Neben dem programmierten Zelltod, der Apoptose, kommt es in Tumoren auch zur Nekrose. Dabei platzen die Zellen und verteilen ihren Inhalt in dem umgebenden Gewebe (Hanahan and Weinberg, 2011). Dies führt zu der Ausschüttung von einer Vielzahl an DAMPs, wie HMGB1, HSP, Fibrogen, Heparinsulfate, Fibronectin, Hyaluronsäure sowie einzel- und doppelsträngiger RNA. Diese

Moleküle aktivieren die TLRs der Tumorzellen, wodurch sie deren Überleben verlängern und die Expression von anti-apoptotischen Proteinen und NF- $\kappa$ B verstärken. Wie bereits beschrieben wurde, kommt es dadurch zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, die Immunzellen anlocken, welche ihrerseits weitere Zytokine, pro-angiogene Mediatoren und Wachstumsfaktoren sezernieren und eine chronische Entzündungssituation hervorrufen können, wodurch das Tumorwachstum begünstigt wird (Ridnour *et al.*, 2013).

Daraus lässt sich für das in dieser Arbeit untersuchte Tumormodell folgende Hypothese aufstellen: Durch nekrotische Zellen im Tumor, kommt es zur Ausschüttung von Nukleinsäuren und anderen DAMPs in beiden Mausstämmen. In den WT Mäusen führt dies zu einer starken und kontinuierlichen TLR-Stimulation der nicht-hämatopoetischen Stromazellen und infiltrierenden Immunzellen. Dies könnte die Entstehung einer chronischen Entzündung begünstigen, wodurch der Tumor in den WT Mäusen weiter wächst. In den TLR-defizienten Mäusen werden die Zellen der Tumormikroumgebung deutlich weniger stimuliert, da ihnen die meisten Rezeptoren für die Erkennung von Nukleinsäuren fehlen. Durch die Tumorantigene wird das Immunsystem aktiviert und es kommt zu einer klassischen anti-tumoralen Reaktion, die wie eine akute Entzündungsreaktion abläuft. Dies könnte die verstärkte Immunzellinfiltration in den Tumoren der TLR-defizienten Mäuse erklären.

Obwohl die Aktivierung von TLR3 und TLR7 durch endogene RNA und von TLR9 durch endogene DNA, beziehungsweise endogene Chromatin-Immunglobulin-Komplexe, lange Zeit bekannt ist (Barrat *et al.*, 2005; Boule *et al.*, 2004; Cavassani *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2005), wurde im Gegensatz zu ihren exogenen Liganden ihre Rolle in der Tumorentwicklung kaum untersucht. In einer Studie mit Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass deren Stimulation mit RNA von allogenen Melanomzellen zur verstärkten Expression von TRIF und TLR3 führte (Goto *et al.*, 2008). Zudem verschlechterte zirkulierende RNA und DNA im Blut von Patienten deren Krankheitsverlauf (Sato *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen Exosomen mit MicroRNAs sezernieren, die den murinen TLR7 bzw. den humanen TLR8 in Immunzellen aktivieren. Dies führte zu einer pro-tumoralen Entzündungsreaktion durch NF- $\kappa$ B-Aktivierung und zur Ausschüttung erhöhter Mengen TNF und IL-6 durch die Immunzellen (Fabbri *et al.*, 2012). Diese Studien bestätigen, dass die kontinuierliche Stimulation der endosomalen TLRs einen pro-tumoralen Effekt hat.

Ein völlig anderer endogener TLR-Stimulus, könnte von Retroviren ausgehen, die von endosomalen TLRs kontrolliert werden (Kane *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012b). Kürzlich wurde entdeckt, dass die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse endogene Retroviren (ERV) enthalten, die bei älteren Tieren eine Leukämie induzieren. Bei jungen Mäusen konnte hingegen kein Einfluss der

Retroviren auf das Immunsystem beobachtet werden. In allen TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen konnte in Thymozyten und Immunzellen aus der Milz, dem Knochenmark und dem Blut, eine Infektion mit ERV nachgewiesen werden, nicht aber in WT Mäusen (Yu *et al.*, 2012b). Welchen Effekt diese Viren auf das Wachstum von soliden Tumoren in den TLR-defizienten Mäusen haben, ist jedoch nicht bekannt.

Die injizierten Tumorzellen könnten in den TLR-defizienten Mäusen durch die Retroviren in dem umliegenden Gewebe infiziert werden, wodurch die Tumorzellen Virus-Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren. Durch diesen zusätzlichen Stimulus könnte es zu einer verstärkten Aktivierung des Immunsystems kommen und dies würde die starke Immuninfiltration in die Tumore der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse erklären. Die Erkennung retroviraler Antigene auf der Oberfläche von Melanomzellen beziehungsweise Nierenkarzinomen durch zytotoxische T-Zellen konnte in zwei unabhängigen Studien gezeigt werden (Schiavetti *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2008). Auch für viele weitere humane Tumoren konnte die Expression von endogenen Retroviren nachgewiesen werden, wie beispielsweise im Melanom, Prostatakarzinom, Kolorektal- und Magentumoren (Büscher *et al.*, 2005; Wang-Johanning *et al.*, 2003; Wentzensen *et al.*, 2007). In einer Brustkrebsstudie, in der ebenfalls Retroviren in den Tumoren nachweisbar waren, konnten CTLs Zellen lysieren, die das HERV-K Protein auf ihrer Oberfläche exprimierten. Zudem führte die Stimulation von PBMCs der Krebspatienten mit HERV-K Antigen-präsentierenden DCs zur T-Zell-Proliferation, sowie Sekretion von T<sub>H</sub>1-Zytokinen (Wang-Johanning *et al.*, 2008).

Sowohl Nukleinsäuren als auch Retroviren stellen einen potenten Stimulus einer TLR-abhängigen Modulation der Tumormikroumgebung dar. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um herauszufinden, ob eine dieser Faktoren die Tumorabstoßung induziert. Die Rolle der Retroviren könnte durch eine antivirale Therapie überprüft werden und durch die Verwendung von DNasen und RNasen könnten Nukleinsäuren in Folgeversuchen inhibiert werden.



## 5.4 Die Interpretation von Versuchen mit Knockout-Mäusen

Die Verwendung von Knockoutmäusen gilt seit vielen Jahren als Standard in der Wissenschaft und bietet eine hervorragende Möglichkeit die Funktion einzelner Gene zu untersuchen. Allerdings muss bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, wie die Generierung der Tiere durchgeführt wird. Da in dieser Arbeit verschiedene Knockoutmäuse verwendet wurden, soll im Folgenden genauer auf diese Methodik eingegangen werden.

### 5.4.1 Einschränkungen bei der Generierung von Knockout-Mäusen

Das Ziel bei der Generierung von Knockout-Mäusen ist, ein funktionales Gen mit einem nicht-funktionalen Gen zu ersetzen. Dafür muss als erstes eine Null-Mutation in einer für die Funktion wichtigen Exonsequenz des gewünschten Gens erzeugt werden. Diese Sequenz wird anschließend in einen Zielvektor überführt. Dieser Vektor muss für die spätere Selektion von erfolgreich transfizierten Zellen ein Antibiotikaresistenz-Gen enthalten. Der Vektor wird in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transfiziert, wo er über homologe Rekombination in das Genom integriert (Eisener-Dorman *et al.*, 2009). Für die Transfektion werden am häufigsten embryonale 129/SV Zellen verwendet, da sie schnell expandieren und genetische Manipulationen leicht vorgenommen werden können (Simpson *et al.*, 1997). Antibiotikaresistente ES-Zellen werden dann in C57BL/6 (BL/6) Blastozysten injiziert und diese in pseudoträchtige BL/6 Weibchen überführt, die daraufhin Chimären mit der gewünschten genetischen Veränderung gebären. Abschließend erfolgt eine Rückkreuzung auf den BL/6 Hintergrund. Der BL/6-Stamm wird bevorzugt, da die Tiere im Vergleich zu dem 129/SV Stamm deutlich besser für die Zucht geeignet sind. Sie erzeugen mehr Nachkommen und zeigen weniger physiologische Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten. Nach mindestens zehn Rückkreuzungen kann ein 99,9% BL/6 Hintergrund erzielt werden (Eisener-Dorman *et al.*, 2009). Doch dies bedeutet nicht, dass es sich um Mäuse handelt, die nur eine Veränderung in einem einzigen Gen aufweisen. Der in Knockout-Mäusen beobachtete Phänotyp kann von zwei „Nebeneffekten“ beeinflusst sein: den flankierenden Genen und dem genetischen Hintergrund. Bei den flankierenden Genen handelt es sich um genetisches Material der 129/SV Mäuse, welches den Bereich des entfernten Gens umgibt. Dabei kann es sich um hunderte von Genen handeln, die den Phänotyp beeinflussen können. Durch die enge Nachbarschaft zu dem entfernten Gen kommt es zu einer Genkopplung. Durch häufige Kreuzungen kann die Anzahl der Gene verringert, aber nicht vollständig entfernt werden. Auch der genetische Hintergrund kann

für einen Phänotyp verantwortlich sein, da selbst durch sehr häufiges Rückkreuzen nie ein 100%iger BL/6 Hintergrund erreicht werden kann (Eisener-Dorman *et al.*, 2009).

### 5.4.2 Die Generierung der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten TLR3/7/9-Dreifach-KO Mäuse wurden durch Verpaarung von TLR3<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup> und TLR9<sup>-/-</sup> Mäusen gezüchtet (Yu *et al.*, 2012b). Die TLR-Einzel-KO Mäuse wurden mit einer zuvor beschriebenen Methode generiert (siehe 5.4.1). Im Fall der TLR7<sup>-/-</sup> und TLR9<sup>-/-</sup> Maus wurde ein Fragment der LRR-Region mit einer Neomycin-Reagenz-Kassette (Neo-Kassette) ersetzt. Bei den TLR3<sup>-/-</sup> Mäusen wurde das dritte und vierte Exon der kodierenden Region mit der Neo-Kassette ausgetauscht (Hemmi *et al.*, 2000; Hemmi *et al.*, 2002; Honda *et al.*, 2003). Die heterozygoten F1-Nachkommen wurden miteinander verpaart, um homozygote TLR-Einzel-KO Mäuse zu erhalten. Bevor aus den Einzel-KO-Mäusen die Dreifach-KO Mäuse generiert wurden, wurden die TLR3<sup>-/-</sup> Mäuse achtmal, die TLR7<sup>-/-</sup> Mäuse sieben Mal, die TLR9<sup>-/-</sup> Mäuse zwölfmal auf den BL/6 Hintergrund rückgekreuzt. Um TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse zu erhalten, wurden die Tiere weitere drei Male mit BL/6 verpaart, um anschließend homozygote Dreifach-KO Mäuse zu generieren. Eine SNP (*single nucleotide polymorphism*)-Analyse des Genoms zeigte, dass die Dreifach-KO Mäuse 85,5% des BL/6 Genoms enthielten (Yu *et al.*, 2012b). Es sind dementsprechend noch 15,5% von dem 129/SV-Hintergrund in den Tieren enthalten. Bei Tumorstudienanalysen in Mäusen der F1-Generation von 129/SV und BL/6 Mäusen zeigte sich ein schnelleres Wachstum der MOPC-Tumore als in BL/6 WT Mäusen (Klein, 2012). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass aus BL/6 Mäusen generierte Tumorzelllinien aufgrund eines verbleibenden 129/SV-Hintergrundes durch eine Alloreaktivität gegen BL/6 Antigene abgestoßen werden. Allerdings wurden deutliche Unterschiede in der Haut von WT und TLR3/7/9 Mäusen auf RNA-Ebene festgestellt. Dies könnte durch den verbleibenden 129/SV-Hintergrund erklärt werden, dessen Einfluss auf die Tumorstudienprogression nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

### 5.4.3 Wie kann das Tumorstudienwachstum in den 3D-Mäusen erklärt werden?

Das Protein UNC93B1 ist für die Signalweiterleitung von TLR3, TLR7 und TLR9 notwendig. Dies konnte durch Experimente mit den 3D-Mäusen gezeigt werden, die eine Missense-Mutation in dem *Unc93b1* Gen aufweisen (Tabeta *et al.*, 2006). Dementsprechend sollten die 3D-Mäuse einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen wie die TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse.

Interessanterweise war die Tumorprogression in den 3D-Mäusen jedoch nicht beeinträchtigt und es kam in keinem der Tiere zu einer Abstoßung des Tumors. Dies deutet auf eine Restaktivität endosomaler TLRs in diesen Mäusen hin, welche kürzlich durch die Stimulation von Makrophagen aus 3D-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Yu *et al.*, 2012b).

Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da UNC93B1 mit allen endosomalen TLRs interagiert und nachweislich für den Transport von TLR7 und TLR9 aus dem ER in die Endolysosomen notwendig ist (Brinkmann *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). Auch TLR3 benötigt UNC93B1, um das ER zu verlassen (Lee *et al.*, 2013). Wie der Transport der TLRs vom ER zu ihrem Zielort abläuft unterscheidet sich zwischen den verschiedenen TLRs und ist noch nicht vollständig geklärt. Während TLR7 direkt in das Endosom transportiert wird, wandert UNC93B1 zusammen mit der inaktiven Form des TLR9 an die Zelloberfläche. Von dort aus wird es in die Endosomen transportiert, wo es durch Spaltung in seine aktive Form umgewandelt wird. Der Transport von TLR13 in das Endosom hingegen scheint unabhängig von UNC93B1 zu erfolgen (Lee *et al.*, 2013).

Neben dem UNC93B1 Protein ist noch ein weiteres TLR-Transportprotein bekannt, das PRAT4A (*protein associated with TLR4*). PRAT4A befindet sich im ER und ist für den Transport von TLR1 und TLR4 zu der Zelloberfläche, sowie für den Transport von TLR9 in die Lysosomen verantwortlich. In Makrophagen ist auch der Transport von TLR7 von PRAT4A abhängig, da die Zytokinsekretion durch das Fehlen von PRAT4A blockiert war (Takahashi *et al.*, 2007). In den 3D-Mäusen können also TLR9 und eventuell TLR7 auch ohne das UNC93B1 Protein das ER verlassen und in andere Zellkompartimente wandern.

Obwohl TLR3 als klassischer endosomaler Rezeptor gilt, wurde er auf der Zelloberfläche von humanen Fibroblasten und lymphatische Endothelzellen entdeckt (Matsumoto *et al.*, 2002; Pegu *et al.*, 2008). Auch Unterpopulationen von murinen Immunzellen und humane NK-Zellen aus dem Blut gesunder Spender exprimierten TLR3 auf deren Oberfläche (Murakami *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2007). Durch die Stimulation mit dem Überstand von Tumorzellen *in vitro* internalisierten die NK-Zellen den Rezeptor, ein Prozess, der durch die Stimulation mit Poly(I:C) inhibiert werden konnte (Xie *et al.*, 2007).

Das Beispiel der 3D-Maus macht deutlich, wie komplex zelluläre Prozesse sind. Durch das Ausschalten eines Gens, kann nicht automatisch von der Blockierung eines gesamten Prozesses ausgegangen werden. Zudem sind möglicherweise andere Funktionen des Gens beeinträchtigt, die den untersuchten Prozess beeinflussen. Dadurch wurde in der vorliegenden Arbeit in den 3D-Mäusen kein vergleichbarer Phänotyp wie in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet.

### 6 Zusammenfassung

Tumore bestehen aus malignen Zellen und dem Tumorstroma. Letzteres setzt sich aus nicht-hämatopoetischen Zellen und dem Immunzellinfiltrat zusammen und macht häufig einen Großteil der Tumormasse aus. Wechselwirkungen zwischen den Tumorzellen und dem Stroma beeinflussen die Biologie der beteiligten Zellen und die Pathophysiologie der Erkrankung. Toll-like Rezeptoren (TLRs) haben eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung des Immunsystems. Die Aktivierung von TLRs kann anti-tumorale Effekte induzieren, die vor allem durch den Einsatz therapeutischer exogener Liganden hervorgerufen werden, während eine pro-tumorale Wirkung vorrangig für endogene Liganden beschrieben wurde. Um diese gegensätzlichen Befunde besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit die Rolle endosomaler TLRs auf den verschiedenen Kompartimenten der Tumormikroumgebung analysiert.

Initiale Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen Aufschluss darüber geben, welche TLRs und nachfolgende Signalwege an der Tumorabstoßung beteiligt sind. Die Untersuchung von Einzel- und Doppel-TLR-Knockoutmäusen zeigte, dass nur durch das Fehlen aller drei endosomaler Rezeptoren eine effiziente Abstoßung eintrat. Die Beteiligung mehrere TLR-Signalwege wurde durch die Tumorabstoßung in den MyD88/Trif<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt. Interessanterweise entwickelten jedoch die meisten der TLR2/3/4/7/9-Knockoutmäuse einen soliden Tumor, was für einen entgegengesetzten Effekt der endosomalen TLRs (3, 7, 9) und der Oberflächenrezeptoren TLR2 und TLR4 spricht.

Um den relativen Beitrag des nicht-hämatopoetischen Stromas und des Immunzellinfiltrats an der Tumorregression zu untersuchen, wurden Knochenmarkchimären eingesetzt. Deren Untersuchung zeigte, dass beide Kompartimente an der Abstoßungsreaktion beteiligt waren. Dies wurde durch den adoptiven Transfer markierter Milzzellen bestätigt, da es nur zur Immunzellrekrutierung in den Tumor kam, wenn auf beiden Kompartimenten endosomale TLRs fehlten. Anschließende Untersuchungen des nicht-hämatopoetischen Stromas zeigten deutliche Unterschiede in der Ausbildung von Tumorgefäßen. Während die Tumore der WT Mäuse von einem feinen Kapillarsystem durchzogen wurden, bildeten sich in den Tumoren der TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse eine geringere Anzahl heterogener Gefäße, die einen deutlich größeren Durchmesser aufwiesen, von Perizyten ummantelt waren und nicht alle Bereiche des Tumors versorgten. Im Kompartiment des hämatopoetischen Stromas konnte gezeigt werden, dass eine lokale anti-tumorale Immunreaktion für die Tumorabstoßung verantwortlich war. Während systemisch keine Unterschiede in der Aktivierung von dendritischen Zellen und T-Zellen festgestellt werden konnten, waren die Tumore der

TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse sehr stark mit Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems infiltriert. Durch Depletionsversuche konnte demonstriert werden, dass sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Abstoßung verantwortlich waren. Dies wurde durch den Befund bestätigt, dass TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäuse nach einmaliger Injektion der Tumorzellen eine Immunität gegen diese Zellen ausbildeten, sodass es zu keiner erneuten Ausbildung eines Tumors kommen konnte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch das Fehlen der endosomalen Toll-like Rezeptoren TLR3, TLR7 und TLR9 Veränderungen in der Tumormikroumgebung auftreten, die zu einer T-Zell-abhängigen Tumorabstoßung führten. Daraus lässt sich ein pro-tumoraler Effekt dieser Rezeptoren in der WT-Situation bzw. die Ermöglichung einer anti-tumoralen Immunreaktion in den TLR3/7/9<sup>-/-</sup> Mäusen ableiten. Dieser Befund ist von besonderer Bedeutung, da endosomale TLRs bislang vorwiegend mit exogener therapeutischer Stimulation in Verbindung gebracht wurden und die Stimulation durch endogene Liganden kaum untersucht ist. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass, unabhängig von therapeutischer Intervention, die endosomale TLR-Expression auf den hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen das Tumorstadium beeinflussen kann. Die TLR-Aktivierung durch bislang nicht identifizierte endogene Liganden könnte zu einer pro-tumoralen Stimulation der Tumorzellen führen. Daher könnte die Inhibierung endosomaler TLRs eine neue Möglichkeit der therapeutischen Intervention bei bestimmten Tumorerkrankungen darstellen.

### Summary

Tumors consist of malignant cells and the tumor stroma, which is composed of non-hematopoietic cells and the infiltrating immune cells. Often the stroma represents the major fraction of the whole tumor mass. The interaction between tumor and stromal cells influences the biology of the involved cells and the pathophysiology of the disease. Toll-like receptors (TLRs) are known as key players in immune activation. The activation of TLRs can induce anti-tumor effects, which are mostly generated by the use of therapeutic exogenous ligands, while pro-tumor effects are primarily described for endogenous ligands. To better understand these contrary indications, the impact of endosomal TLR expression on different compartments of the tumor microenvironment was analyzed in this thesis.

Firstly the aim was to investigate which TLRs and subsequent pathways are involved in the tumor regression in the TLR3/7/9<sup>-/-</sup> mice. Tumor growth analysis in single and double TLR knockout mice showed that depletion of all three TLRs is necessary to induce tumor rejection. The involvement of several TLR pathways was confirmed by tumor rejection in MyD88/Trif<sup>-/-</sup> mice. Surprisingly, the majority of TLR2/3/4/7/9<sup>-/-</sup> mice developed a solid tumor, revealing a converse function of endosomal TLRs (3, 7, 9) and TLR2/4 located on the cell surface.

To identify the relative contribution of the non-hematopoietic stromal cells and the infiltrating immune cells to tumor regression, bone marrow chimeras were generated. The investigation of these chimeras demonstrated the involvement of both compartments in the process of tumor rejection. This was confirmed by the adoptive transfer of labeled splenocytes and it was found that only if both compartments were deficient for endosomal TLRs then immune cells would be recruited to the tumor. Further investigation of the non-hematopoietic compartment revealed clear differences in the blood vessel development. While in WT mice, tumors were supplied by a fine capillary network, TLR3/7/9<sup>-/-</sup> mice developed a reduced number of tumor vessels which were characterized by a heterogeneous structure. TLR-deficient vessels showed an increased diameter and coverage by pericytes compared to tumor vessels of WT mice. Investigation of the hematopoietic compartment indicates a local anti-tumor response of the immune system. While no systemic activation of dendritic cells or T cells could be determined, tumors of TLR mice were highly infiltrated by innate and adaptive immune cells. Depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo* demonstrated that both cell types are necessary for tumor rejection. This was verified by the observation, that TLR3/7/9<sup>-/-</sup> tumor regressor mice were protected against a secondary challenge by the same tumor cell line.

In summary, the experiments of this thesis showed for the first time that depletion of endosomal TLR3, TLR7 and TLR9 induces modification of the tumor microenvironment resulting in a T cell dependent tumor rejection. The data suggest a tumor promoting effect in the WT situation or alternatively the enabling of previously inactive anti-tumor mechanisms in TLR3/7/9<sup>-/-</sup> mice. These findings are of relevance as previously endosomal TLRs were mainly associated with exogenous therapeutic TLR stimulation while the relevance of endogenous signaling via these TLRs is largely unknown. This study now shows an effect of endosomal TLR expression by non-hematopoietic and hematopoietic stroma cells on tumor growth in the absence of therapeutic intervention. TLR activation, by still elusive ligands, in different compartments of the tumor/stroma entity by endogenous ligands could promote tumor growth. Thus inhibition of endosomal TLRs could lead to new therapeutic options in solid tumors.

## 7 Literaturverzeichnis

Akin, H. and Tozun, N. (2014) Diet, microbiota, and colorectal cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* 48 Suppl 1, S67-S69.

Anderson, K. V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.

Anwar, M. A., Basith, S., and Choi, S. (2013) Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp. Mol. Med.* 45, e11.

Aranda, F., Vacchelli, E., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Cremer, I., Henrik Ter, M. J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2014) Trial Watch: Toll-like receptor agonists in oncological indications. *Oncoimmunology*. 3, e29179.

Baiersdörfer, M., Schwarz, M., Seehafer, K., Lehmann, C., Heit, A., Wagner, H., Kirschning, C. J., and Koch-Brandt, C. (2010) Toll-like receptor 3 mediates expression of clusterin/apolipoprotein J in vascular smooth muscle cells stimulated with RNA released from necrotic cells. *Exp. Cell Res.* 316, 3489-3500.

Balabanov, R., Washington, R., Wagnerova, J., and Dore-Duffy, P. (1996) CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2. *Microvasc. Res.* 52, 127-142.

Barr, T. A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J., and Gray, D. (2007) TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3040-3053.

Barrat, F. J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J. H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R. L. (2005) Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 202, 1131-1139.

Becker, J. C., Andersen, M. H., Schrama, D., and Thor, S. P. (2013) Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 1137-1148.

Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., and Segal, D. M. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24, 528-533.

Bergers, G. and Song, S. (2005) The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* 7, 452-464.

Biswas, S. K. and Mantovani, A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889-896.

Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J. P., Bates, E. E., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y. J., Trinchieri, G., and O'Garra, A. (2006) Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J. Immunol.* 177, 7551-7558.

Boule, M. W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I. R. (2004) Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J. Exp. Med.* 199, 1631-1640.



- Brandau, S., Dumitru, C. A., and Lang, S. (2013a) Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin. Immunopathol.* 35, 163-176.
- Brandau, S., Moses, K., and Lang, S. (2013b) The kinship of neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer: cousins, siblings or twins? *Semin. Cancer Biol.* 23, 171-182.
- Brinkmann, M. M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H. L., and Kim, Y. M. (2007) The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 177, 265-275.
- Büscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., and Denner, J. (2005) Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res.* 65, 4172-4180.
- Carmeliet, P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 4-10.
- Cavassani, K. A., Ishii, M., Wen, H., Schaller, M. A., Lincoln, P. M., Lukacs, N. W., Hogaboam, C. M., and Kunkel, S. L. (2008) TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J. Exp. Med.* 205, 2609-2621.
- Chouaib, S., Kieda, C., Benlalam, H., Noman, M. Z., Mami-Chouaib, F., and Ruegg, C. (2010) Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells. *Crit Rev. Immunol.* 30, 529-545.
- Chuang, H. C., Huang, C. C., Chien, C. Y., and Chuang, J. H. (2012) Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 48, 226-232.
- Comito, G., Giannoni, E., Segura, C. P., Barcellos-de-Souza, P., Raspollini, M. R., Baroni, G., Lanciotti, M., Serni, S., and Chiarugi, P. (2014) Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene* 33, 2423-2431.
- Curiel, T. J. (2007) Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest* 117, 1167-1174.
- De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di, C., V, Doglioni, C., and Protti, M. P. (2011) Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 208, 469-478.
- DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., Gallagher, W. M., Wadhwani, N., Keil, S. D., Junaid, S. A., Rugo, H. S., Hwang, E. S., Jirstrom, K., West, B. L., and Coussens, L. M. (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 1, 54-67.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., and Chen, L. (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793-800.
- Dumitru, C. A., Lang, S., and Brandau, S. (2013) Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 23, 141-148.
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., and Gelinas, C. (2006) Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25, 6800-6816.

Dvorak, H. F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650-1659.

Egan, C. E., Sukhumavasi, W., Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. (2009) Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. *Clin. Exp. Immunol.* 156, 17-24.

Eisener-Dorman, A. F., Lawrence, D. A., and Bolivar, V. J. (2009) Cautionary insights on knockout mouse studies: the gene or not the gene? *Brain Behav. Immun.* 23, 318-324.

Elkabets, M., Ribeiro, V. S., Dinarello, C. A., Ostrand-Rosenberg, S., Di Santo, J. P., Apte, R. N., and Vosschenrich, C. A. (2010) IL-1 $\beta$  regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur. J. Immunol.* 40, 3347-3357.

Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T., and Hanahan, D. (2010) Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Cancer Cell* 17, 135-147.

Ertürk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C. P., Hojer, C. D., Egen, J. G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H. U. (2012) Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* 7, 1983-1995.

Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G. J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G. H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M. A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., and Croce, C. M. (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, E2110-E2116.

Fitzner, N., Clauberg, S., Essmann, F., Liebmann, J., and Kolb-Bachofen, V. (2008) Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 138-146.

Fridlender, Z. G. and Albelda, S. M. (2012) Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33, 949-955.

Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A. S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A. J., Subbaramaiah, K., Cooper, H. S., Itzkowitz, S. H., and Abreu, M. T. (2007) Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 133, 1869-1881.

Gajewski, T. F. (2007) Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 13, 5256-5261.

Gee, M. S., Procopio, W. N., Makonnen, S., Feldman, M. D., Yeilding, N. M., and Lee, W. M. (2003) Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *Am. J. Pathol.* 162, 183-193.

Goldberg, J. L. and Sondel, P. M. (2015) Enhancing Cancer Immunotherapy Via Activation of Innate Immunity. *Semin. Oncol.* 42, 562-572.

Gonzalez-Reyes, S., Marin, L., Gonzalez, L., Gonzalez, L. O., del Casar, J. M., Lamelas, M. L., Gonzalez-Quintana, J. M., and Vizoso, F. J. (2010) Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC. Cancer* 10, 665.

Goto, Y., Arigami, T., Kitago, M., Nguyen, S. L., Narita, N., Ferrone, S., Morton, D. L., Irie, R. F., and Hoon, D. S. (2008) Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3642-3653.

Goubran, H. A., Kotb, R. R., Stakiw, J., Emara, M. E., and Burnouf, T. (2014) Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth Metastasis* 7, 9-18.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harlin, H., Kuna, T. V., Peterson, A. C., Meng, Y., and Gajewski, T. F. (2006) Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 1185-1197.

Harper, J. and Sainson, R. C. (2014) Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin. Cancer Biol.* 25, 69-77.

Helfrich, I., Scheffrahn, I., Bartling, S., Weis, J., von, F., V, Middleton, M., Kato, M., Ergun, S., Augustin, H. G., and Schadendorf, D. (2010) Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J. Exp. Med.* 207, 491-503.

Hemmi, H. and Akira, S. (2005) TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem. Immunol. Allergy* 86, 120-135.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3, 196-200.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., Ohteki, T., Kaisho, T., Takaoka, A., Akira, S., Seya, T., and Taniguchi, T. (2003) Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10872-10877.

Hong, E. H., Chang, S. Y., Lee, B. R., Kim, Y. S., Lee, J. M., Kang, C. Y., Kweon, M. N., and Ko, H. J. (2012) Blockade of Myd88 signaling induces antitumor effects by skewing the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells. *Int. J. Cancer* 132, 2839-48.

Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K. L., Chen, Y., Chen, S. H., Mayer, L., Unkeless, J. C., and Xiong, H. (2005) Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 65, 5009-5014.

Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S., and Iwasaki, A. (2011) Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 5354-5359.

Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C. A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R. A., Molina, D. A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., Dai, R. M., Kiu, H., Cardone, M., Naik, S., Patri, A. K., Wang, E., Marincola, F.

- M., Frank, K. M., Belkaid, Y., Trinchieri, G., and Goldszmid, R. S. (2013) Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 342, 967-970.
- Ilvesaro, J. M., Merrell, M. A., Swain, T. M., Davidson, J., Zayzafoon, M., Harris, K. W., and Selander, K. S. (2007) Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate* 67, 774-781.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987-995.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 16, 343-353.
- Jack, G. W., Wiblin, C. N., and McMahon, P. C. (1983) The effect of histidine ammonia-lyase on some murine tumours. *Leuk. Res.* 7, 421-429.
- Johnson, D. J. and Ohashi, P. S. (2013) Molecular programming of steady-state dendritic cells: impact on autoimmunity and tumor immune surveillance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1284, 46-51.
- Jones, S. A. (2005) Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 175, 3463-3468.
- Jung, D. W., Che, Z. M., Kim, J., Kim, K., Kim, K. Y., Williams, D., and Kim, J. (2010) Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int. J. Cancer* 127, 332-344.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* 3, 499.
- Kalluri, R. and Zeisberg, M. (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 392-401.
- Kane, M., Case, L. K., Wang, C., Yurkovetskiy, L., Dikiy, S., and Golovkina, T. V. (2011) Innate immune sensing of retroviral infection via Toll-like receptor 7 occurs upon viral entry. *Immunity*. 35, 135-145.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373-384.
- Kawasaki, T. and Kawai, T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 5, 461.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W. W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J. L., and Karin, M. (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457, 102-106.
- Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E., and Ploegh, H. L. (2008) UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452, 234-238.
- Klein, J. C. (2012) Effekt therapeutischer TLR-Liganden auf Tumorzellen und Zellen des Tumorstromas; Masterarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- Klein, J. C., Wild, C. A., Lang, S., and Brandau, S. (2016) Differential immunomodulatory activity of tumor cell death induced by cancer therapeutic toll-like receptor ligands. *Cancer Immunol. Immunother.*

- Konishi, J., Yamazaki, K., Azuma, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., and Nishimura, M. (2004) B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin. Cancer Res.* 10, 5094-5100.
- Kraman, M., Bambrough, P. J., Arnold, J. N., Roberts, E. W., Magiera, L., Jones, J. O., Gopinathan, A., Tuveson, D. A., and Fearon, D. T. (2010) Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$ . *Science* 330, 827-830.
- Lakshmi, N. B., Eshvendar, R. K., Shantikumar, S., and Ramakrishna, S. (2013) Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm. Res.* 62, 823-834.
- Lau, C. M., Broughton, C., Tabor, A. S., Akira, S., Flavell, R. A., Mamula, M. J., Christensen, S. R., Shlomchik, M. J., Viglianti, G. A., Rifkin, I. R., and Marshak-Rothstein, A. (2005) RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* 202, 1171-1177.
- Lee, B. L., Moon, J. E., Shu, J. H., Yuan, L., Newman, Z. R., Schekman, R., and Barton, G. M. (2013) UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife*. 2, e00291.
- Lee, C. H., Wu, C. L., and Shiau, A. L. (2010) Toll-like receptor 4 signaling promotes tumor growth. *J. Immunother.* 33, 73-82.
- Lee, Y. K. and Mazmanian, S. K. (2010) Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330, 1768-1773.
- Lejeune, F. J., Lienard, D., Matter, M., and Ruegg, C. (2006) Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun.* 6, 6.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Li, H., Fan, X., and Houghton, J. (2007) Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell Biochem.* 101, 805-815.
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., and Reisfeld, R. A. (2009) Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS. ONE*. 4, e7965.
- Lin, K. Y., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K. F., Levitsky, H. I., August, J. T., Pardoll, D. M., and Wu, T. C. (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 56, 21-26.
- Lion, E., Anguille, S., Berneman, Z. N., Smits, E. L., and Van, T., V (2011) Poly(I:C) enhances the susceptibility of leukemic cells to NK cell cytotoxicity and phagocytosis by DC. *PLoS. ONE*. 6, e20952.
- Luo, J. L., Maeda, S., Hsu, L. C., Yagita, H., and Karin, M. (2004) Inhibition of NF- $\kappa$ B in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNF $\alpha$  to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 6, 297-305.
- Luo, Q., Hu, S., Yan, M., Sun, Z., Chen, W., and Chen, F. (2012) Activation of Toll-like receptor 3 induces apoptosis of oral squamous carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1266-1275.

- Man, S. M. and Kanneganti, T. D. (2015) Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* 265, 6-21.
- Matijevic, T. and Pavelic, J. (2011) The dual role of TLR3 in metastatic cell line. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 701-712.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., and Seya, T. (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1364-1369.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Mishra, P. J., Mishra, P. J., Humeniuk, R., Medina, D. J., Alexe, G., Mesirov, J. P., Ganesan, S., Glod, J. W., and Banerjee, D. (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 68, 4331-4339.
- Moses, K., Klein, J. C., Mann, L., Klingberg, A., Gunzer, M., and Brandau, S. (2016) Survival of residual neutrophils and accelerated myelopoiesis limit the efficacy of antibody-mediated depletion of Ly-6G<sup>+</sup> cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.*
- Murakami, Y., Fukui, R., Motoi, Y., Kanno, A., Shibata, T., Tanimura, N., Saitoh, S., and Miyake, K. (2014) Roles of the cleaved N-terminal TLR3 fragment and cell surface TLR3 in double-stranded RNA sensing. *J. Immunol.* 193, 5208-5217.
- Nagarajan, U. M., Sikes, J., Prantner, D., Andrews, C. W., Jr., Frazer, L., Goodwin, A., Snowden, J. N., and Darville, T. (2011) MyD88 deficiency leads to decreased NK cell gamma interferon production and T cell recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection, but a predominant Th1 response and enhanced monocytic inflammation are associated with infection resolution. *Infect. Immun.* 79, 486-498.
- Nussenbaum, F. and Herman, I. M. (2010) Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J. Oncol.* 2010, 132641.
- Ochi, A., Nguyen, A. H., Bedrosian, A. S., Mushlin, H. M., Zarbakhsh, S., Barilla, R., Zambirinis, C. P., Fallon, N. C., Rehman, A., Pylayeva-Gupta, Y., Badar, S., Hajdu, C. H., Frey, A. B., Bar-Sagi, D., and Miller, G. (2012) MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. *J. Exp. Med.* 209, 1671-1687.
- Ohgashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., Mizuno, T., Yoriki, R., Kashizuka, H., Yane, K., Tsushima, F., Otsuki, N., Yagita, H., Azuma, M., and Nakajima, Y. (2005) Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 2947-2953.
- Ohshio, Y., Teramoto, K., Hanaoka, J., Tezuka, N., Itoh, Y., Asai, T., Daigo, Y., and Ogasawara, K. (2015) Cancer-associated fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based vaccine. *Cancer Sci.* 106, 134-142.
- Oldenburg, M., Kruger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H., and Kirschning, C. J. (2012) TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 337, 1111-1115.

- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Renzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.
- Pardoll, D. M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252-264.
- Park, C. G., Takahara, K., Umemoto, E., Yashima, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Clausen, B. E., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2001) Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int. Immunol.* 13, 1283-1290.
- Pegu, A., Qin, S., Fallert Junecko, B. A., Nisato, R. E., Pepper, M. S., and Reinhart, T. A. (2008) Human lymphatic endothelial cells express multiple functional TLRs. *J. Immunol.* 180, 3399-3405.
- Pieper, C., Marek, J. J., Unterberg, M., Schwerdtle, T., and Galla, H. J. (2014) Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro. *Brain Res.* 1550, 1-8.
- Pieper, C., Pieloch, P., and Galla, H. J. (2013) Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1524, 1-11.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461-466.
- Pradere, J. P., Dapito, D. H., and Schwabe, R. F. (2014) The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene* 33, 3485-3495.
- Rakoff-Nahoum, S. and Medzhitov, R. (2007) Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* 317, 124-127.
- Ren, T., Wen, Z. K., Liu, Z. M., Liang, Y. J., Guo, Z. L., and Xu, L. (2007) Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1704-1709.
- Ribeiro, A. L. and Okamoto, O. K. (2015) Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment. *Stem Cells Int.* 2015, 868475.
- Ridnour, L. A., Cheng, R. Y., Switzer, C. H., Heinecke, J. L., Ambs, S., Glynn, S., Young, H. A., Trinchieri, G., and Wink, D. A. (2013) Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment--poor prognosis or new therapeutic opportunity. *Clin. Cancer Res.* 19, 1340-1346.
- Roca, H., Varsos, Z. S., Sud, S., Craig, M. J., Ying, C., and Pienta, K. J. (2009) CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J. Biol. Chem.* 284, 34342-34354.
- Rüegg, C., Yilmaz, A., Bieler, G., Bamat, J., Chaubert, P., and Lejeune, F. J. (1998) Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nat. Med.* 4, 408-414.
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., and Anderson, A. C. (2010) Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 207, 2187-2194.

- Salcedo, R., Cataisson, C., Hasan, U., Yuspa, S. H., and Trinchieri, G. (2013) MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends Immunol.* 34, 379-389.
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N., and Hoon, D. S. (2009) Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2 Suppl 1, 205-214.
- Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T., and Coulie, P. G. (2002) A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.* 62, 5510-5516.
- Schreiber, H. and Rowley, D. A. (2010) Cancer. Awakening immunity. *Science* 330, 761-762.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163-189.
- Seregin, S. S., Aldhamen, Y. A., Appledorn, D. M., Aylsworth, C. F., Godbehere, S., Liu, C. J., Quiroga, D., and Amalfitano, A. (2011) TRIF is a critical negative regulator of TLR agonist mediated activation of dendritic cells in vivo. *PLoS. ONE.* 6, e22064.
- Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A., Zhang, T., Wen, S., Wang, J., Yang, J., Fu, S., and Zhang, D. (2011) A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J. Biol. Chem.* 286, 4517-4524.
- Simpson, E. M., Linder, C. C., Sargent, E. E., Davisson, M. T., Mobraaten, L. E., and Sharp, J. J. (1997) Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat. Genet.* 16, 19-27.
- Spanos, W. C., Hoover, A., Harris, G. F., Wu, S., Strand, G. L., Anderson, M. E., Klingelutz, A. J., Hendriks, W., Bossler, A. D., and Lee, J. H. (2008) The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J. Virol.* 82, 2493-2500.
- Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C., and Klinman, D. M. (2011) TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 29, 3341-3355.
- Stockmann, C., Schadendorf, D., Klose, R., and Helfrich, I. (2014) The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. *Front Oncol.* 4, 69.
- Summerhayes, I. C. and Franks, L. M. (1979) Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 1017-1023.
- Swann, J. B., Vesely, M. D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R. D., and Smyth, M. J. (2008) Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 652-656.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., Shamel, L., Herskovits, A. A., Portnoy, D. A., Cooke, M., Tarantino, L. M., Wiltshire, T., Steinberg, B. E., Grinstein, S., and Beutler, B. (2006) The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* 7, 156-164.
- Takahashi, K., Shibata, T., Akashi-Takamura, S., Kiyokawa, T., Wakabayashi, Y., Tanimura, N., Kobayashi, T., Matsumoto, F., Fukui, R., Kouro, T., Nagai, Y., Takatsu, K., Saitoh, S., and Miyake, K.



- (2007) A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.* 204, 2963-2976.
- Takahashi, Y., Harashima, N., Kajigaya, S., Yokoyama, H., Cherkasova, E., McCoy, J. P., Hanada, K., Mena, O., Kurlander, R., Tawab, A., Srinivasan, R., Lundqvist, A., Malinzak, E., Geller, N., Lerman, M. I., and Childs, R. W. (2008) Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. *J. Clin. Invest* 118, 1099-1109.
- Tengroth, L., Millrud, C. R., Kvarnhammar, A. M., Kumlien, G. S., Latif, L., and Cardell, L. O. (2014) Functional effects of Toll-like receptor (TLR)3, 7, 9, RIG-I and MDA-5 stimulation in nasal epithelial cells. *PLoS. ONE.* 9, e98239.
- Trellakis, S., Bruderek, K., Dumitru, C. A., Gholaman, H., Gu, X., Bankfalvi, A., Scherag, A., Hutte, J., Dominas, N., Lehnerdt, G. F., Hoffmann, T. K., Lang, S., and Brandau, S. (2011a) Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int. J. Cancer* 129, 2183-2193.
- Trellakis, S., Farjah, H., Bruderek, K., Dumitru, C. A., Hoffmann, T. K., Lang, S., and Brandau, S. (2011b) Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24, 683-693.
- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012) Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 1, 894-907.
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., and Smyth, M. J. (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235-271.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., and Ugolini, S. (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44-49.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Jian, B., Azerou, R., Lu, D. W., Chen, D. T., and Johanning, G. L. (2003) Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. *Cancer* 98, 187-197.
- Wang-Johanning, F., Radvanyi, L., Rycak, K., Plummer, J. B., Yan, P., Sastry, K. J., Piyathilake, C. J., Hunt, K. K., and Johanning, G. L. (2008) Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Res.* 68, 5869-5877.
- Wentzensen, N., Coy, J. F., Knaebel, H. P., Linnebacher, M., Wilz, B., Gebert, J., and von Knebel, D. M. (2007) Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers. *Int. J. Cancer* 121, 1417-1423.
- Werthmöller, N., Frey, B., Wunderlich, R., Fietkau, R., and Gaipl, U. S. (2015) Modulation of radiochemoimmunotherapy-induced B16 melanoma cell death by the pan-caspase inhibitor zVAD-

fmk induces anti-tumor immunity in a HMGB1-, nucleotide- and T-cell-dependent manner. *Cell Death. Dis.* 6, e1761.

Wild, C. A., Brandau, S., Lindemann, M., Lotfi, R., Hoffmann, T. K., Lang, S., and Bergmann, C. (2010) Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 136, 1253-1259.

Wu, M. H., Hong, H. C., Hong, T. M., Chiang, W. F., Jin, Y. T., and Chen, Y. L. (2011) Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. *Clin. Cancer Res.* 17, 1306-1316.

Xie, L., Pries, R., Kesselring, R., Wulff, S., and Wollenberg, B. (2007) Head and neck cancer triggers the internalization of TLR3 in natural killer cells. *Int. J. Mol. Med.* 20, 493-499.

Yang, H. Z., Cui, B., Liu, H. Z., Mi, S., Yan, J., Yan, H. M., Hua, F., Lin, H., Cai, W. F., Xie, W. J., Lv, X. X., Wang, X. X., Xin, B. M., Zhan, Q. M., and Hu, Z. W. (2009) Blocking TLR2 activity attenuates pulmonary metastases of tumor. *PLoS. ONE.* 4, e6520.

Yu, L., Wang, L., and Chen, S. (2012a) Exogenous or endogenous Toll-like receptor ligands: which is the MVP in tumorigenesis? *Cell Mol. Life Sci.* 69, 935-949.

Yu, L., Wang, L., and Chen, S. (2013a) Dual character of Toll-like receptor signaling: pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 144-154.

Yu, L., Wang, L., and Chen, S. (2013b) Dual character of Toll-like receptor signaling: pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 144-154.

Yu, L. X., Yan, H. X., Liu, Q., Yang, W., Wu, H. P., Dong, W., Tang, L., Lin, Y., He, Y. Q., Zou, S. S., Wang, C., Zhang, H. L., Cao, G. W., Wu, M. C., and Wang, H. Y. (2010) Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents. *Hepatology* 52, 1322-1333.

Yu, P., Lubben, W., Slomka, H., Gebler, J., Konert, M., Cai, C., Neubrandt, L., Prazeres da, C. O., Paul, S., Dehnert, S., Dohne, K., Thanisch, M., Storsberg, S., Wiegand, L., Kaufmann, A., Nain, M., Quintanilla-Martinez, L., Bettio, S., Schnierle, B., Kolesnikova, L., Becker, S., Schnare, M., and Bauer, S. (2012b) Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors. *Immunity.* 37, 867-879.

Zhou, Q., Munger, M. E., Veenstra, R. G., Weigel, B. J., Hirashima, M., Munn, D. H., Murphy, W. J., Azuma, M., Anderson, A. C., Kuchroo, V. K., and Blazar, B. R. (2011) Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 117, 4501-4510.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AEC	Aminoethylcabazol
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BL/6	C57BL/6
bmDCs	DCs, aus dem Knochenmark generiert
CAFs	<i>cancer-associated fibroblasts</i>
CAFs	tumor-infiltrierenden Fibroblasten
CTLs	zytotoxische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen
DAMPs	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DBE	Dibenzylether
DCs	dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
ECM	extrazelluläre Matrix ( <i>extracellular matrix</i> )
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERV	endogene Retroviren
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FSP	<i>fibroblast surface protein</i>
GLA	<i>glucopyranosyl lipid adjuvant</i>
H&E	Hämatoxilin/Eosin
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPs	Hitzeschockproteine
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KO	Knockout
LLC	<i>Lewis lung carcinoma</i>
MACS	Magnetic Activated Cell Sorter
MDSCs	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHC-I	MHC-Klasse I
MPL	Monophosphoryl-Lipid A
MSCs	mesenchymale Stammzellen
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
Neo	Neomycin-Reagenz-Kassette
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	natürlichen Killerzellen
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMP	Mustererkennungszereptoren ( <i>pathogen-associated microbial pattern</i> )
PD1	<i>programmed cell death protein 1</i>
Perm Wash	Permeabilisierungspuffer
PFA	Paraformaldehyd
PRAT4A	<i>protein associated with TLR4</i>
qRT-PCR	qualitative Real Time-Polymerasekettenreaktion
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene-I</i>
RNA (ss, ds)	Ribonukleinsäure ( <i>single stranded, double stranded</i> )
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
s.c.	subkutan
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
TAMs	tumor-assoziierte Makrophagen
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
Tim-3	<i>T cell immunoglobulin mucin 3</i>
TIR	Toll-Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
T <sub>regs</sub>	regulatorische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
Trif	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp

## Abkürzungsverzeichnis

---

$\alpha$ -SMA      *alpha-smooth muscle actin*

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der drei Phasen der Tumor-Immunzell-Interaktion...	14
Abb. 1.2: Die Erkennung von PAMPs durch intrazelluläre TLRs und die Signalweiterleitung über Adaptermoleküle.....	17
Abb. 4.1: Abstoßung von MOPC-Tumoren in TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	48
Abb. 4.2: TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäuse stoßen weitere Tumorzelllinien ab.....	49
Abb. 4.3: Orthotopes Wachstum der MOPC-Tumore in WT und TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen	50
Abb. 4.4: Erhöhter Zelltod in Tumoren aus TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	51
Abb. 4.5: TLR-Doppel-KO Mäuse entwickeln solide Tumore.....	53
Abb. 4.6: Der Einfluss von TLR2 und TLR4 auf das Tumorstadium.....	53
Abb. 4.7: Keine Tumorstadium in ASC <sup>-/-</sup> und 3D-Mäusen.....	54
Abb. 4.8: Der MyD88 und der Trif-Signalweg beeinflussen die Tumorstadium.....	55
Abb. 4.9: Kein Einfluss der kommensalen Bakterien auf das Tumorstadium.....	57
Abb. 4.10: Der Mikroarrays zeigt deutliche Unterschiede in der Genregulation von WT und TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	58
Abb. 4.11: Verifizierung der Arraydaten mittels qRT-PCR.....	60
Abb. 4.12: Intrinsische Unterschiede in der Genexpression bei WT und TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	62
Abb. 4.13: Tumore aus TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen produzieren erhöhte Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen.....	63
Abb. 4.14: Für die Tumorstadium ist die Kooperation von TLR-defizienten Immunzellen und TLR-defizientem nicht-hämatopoetischem Stroma notwendig.....	65
Abb. 4.15: Kein Einfluss von Hautfibroblasten auf das Tumorstadium.....	66
Abb. 4.16: Tumore aus TLR-defizienten Mäusen weisen ein verändertes Gefäßsystem auf.....	68
Abb. 4.17: Charakterisierung des Tumorgefäßsystems in WT und TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen....	69
Abb. 4.18: TLR-Defizienz auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen ist für die starke Infiltration des Tumors mit Immunzellen notwendig.....	71
Abb. 4.19: Analyse des Blutes und sekundärer lymphatischer Organe.....	72
Abb. 4.20: Keine systemische Hyperaktivierung von DCs in naiven und tumortragenden TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	74
Abb. 4.21: Keine systemische Hyperaktivierung von T-Zellen in tumortragenden TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	75

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 4.22: Verstärkte Infiltration von Antigen-präsentierenden Zellen in Tumoren aus TLR-defizienten Mäusen.....	77
Abb. 4.23: Starke Tumordinfiltration mit T-Zellen in TLR-defizienten Mäusen.....	78
Abb. 4.24: Erhöhte Anzahl zytotoxischer Zellen in Tumoren aus TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	79
Abb. 4.25: T-Zell-abhängige Tumorabstoßung in TLR3/7/9 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	80

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Zelllinien und deren Generierung.....	21
Tab. 2.2: Mausstämme und deren Herkunft.....	22
Tab. 2.3: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tab. 2.4: Geräte.....	23
Tab. 2.5: Chemikalien und andere Substanzen.....	25
Tab. 2.6: Zusammensetzung von Puffer und weitere Lösungen.....	27
Tab. 2.7: Zellkulturmedien für die verschiedenen Zelltypen.....	28
Tab. 2.8: Stimulanzien für <i>in vitro</i> Versuche.....	28
Tab. 2.9: Kits.....	29
Tab. 2.10.1: Histologie primäre Antikörper.....	29
Tab. 2.10.2: Durchflusszytometrie primäre Antikörper.....	30
Tab. 2.10.3: sekundäre Antikörper für die Histologie oder Durchflusszytometrie.....	30
Tab. 2.10.4: Isotyp-Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	31
Tab. 2.10.5: Antikörper für <i>in vivo</i> Anwendungen.....	31
Tab. 2.11: Murine Primersequenzen für die qRT-PCR.....	31
Tab. 2.12: Software.....	32
Tab. 3.1: Färbeprotokolle für die Immunfluoreszenzfärbung.....	42
Tab. 3.2: Laser- und Filtereinstellung des Lightsheet-Mikroskops.....	44



## 11 Anhang

### Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

#### PUBLIKATIONEN

---

Klein, J. C., Wild, C. A., Lang, S., and Brandau, S. *Differential immunomodulatory activity of tumor cell death induced by cancer therapeutic toll-like receptor ligands*. Cancer Immunol Immunother, 2016 Jun; 65(6):689-700.

Moses, K., Klein, J. C., Mann, L., Klingberg, A., Gunzer, M., and Brandau, S. *Survival of residual neutrophils and accelerated myelopoiesis limit the efficacy of antibody-mediated depletion of Ly-6G+ cells in tumor-bearing mice*. J Leukoc Biol, 2016 Jun; 99(6):811-823.

#### VORTRÄGE

---

J.C. Klein. *Absence of Toll-like receptor signaling on host cells results in T cell dependent tumor rejection- a new mechanism of anti-tumor immunity?* 14. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen, 2015

J.C. Klein. *Induction of immunomodulatory cell death by synthetic RNA mimetics*. BIOME Retreat, Essen, 2014

J.C. Klein. *Cytosolic application of synthetic RNA induces an immune stimulatory tumor cell death*. 8. Winterseminar der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Pichl, Österreich, 2014

J.C. Klein. *Induction of cell death by an endosomal Toll-like-receptor ligand on head and neck squamous cell carcinoma*. 3. Symposium zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie, Leipzig, 2013

#### POSTERPRÄSENTATIONEN

---

J.C. Klein. *Absence of Toll-like receptor signaling on host cells results in T cell dependent tumor rejection- a new mechanism of anti-tumor immunity?* 14. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen, 2015

J.C. Klein. *Induction of immunomodulatory cell death by synthetic RNA mimetics*. DKFZ-Allianz Forum: Tumor Microenvironment, Metabolism and Metasasis, Heidelberg, 2015

J.C. Klein. *Induction of immunomodulatory cell death by synthetic RNA mimetics*. 1st international Symposium in Head and Neck Cancer, Essen, 2015

J.C. Klein. *Differential effects of Poly(I:C) and Imiquimod on immunogenic tumor cell death*. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Mainz, 2013

J.C. Klein. *Differential effects of poly(I:C) and imiquimod on immunogenic tumor cell death*. 13. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen, 2013

J.C. Klein. *Synthetic viral RNA compounds exert a proapoptotic and antitumoral effect in head and neck squamous cell carcinoma*. 12. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen, 2012

J.C. Klein. *Differential effects of synthetic toll-like-receptor (TLR) 3 versus TLR7 ligands on the induction of cell death in head and neck squamous cell carcinoma*. BIOME Retreat, Hamminkeln, 2012

J.C. Klein. *Effekte von TLR-Liganden auf Tumorzellen*. 2. Symposium zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie, Lübeck, 2012

### Danksagung

Ich danke Prof. Sven Brandau, dass er sich für das spannende Thema meiner Doktorarbeit genauso begeistert hat wie ich und wir gemeinsam Lösungen für die zahlreichen überraschenden Befunde suchen konnten. Die regelmäßigen Gruppenbesprechungen halfen dabei das Projekt in die richtige Richtung zu lenken. Durch die Teilnahme an mehreren Kongressen ermöglichte er mir meinen Horizont zu erweitern und weitere interessante Themengebiete und Wissenschaftler kennenzulernen.

Des Weiteren danke ich Prof. Carsten Kirschning für die Bereitstellung der Knockoutmäuse und seine Ideen zu der Weiterentwicklung dieses Projektes. Seiner Arbeitsgruppe, allen voran Thomas Scholtysik, danke ich für die Zucht der Mäuse und dafür, dass ich mich an alle mit methodischen Fragen wenden konnte.

Ganz besonders möchte ich mich für die fachliche, methodische und emotionale Unterstützung meiner Kollegen bedanken. Ich bedanke mich bei allen, die mir die vielen Methoden und Programme beigebracht haben. In diesem Zusammenhang ist der außergewöhnliche Einsatz von Kirsten zu erwähnen. Durch ihre fachliche Unterstützung konnte sie so manches Problem lösen und ich konnte mich immer auf ihre Hilfe verlassen. Zudem wurde das Arbeiten durch ihre gute Organisation des Labors erleichtert. Petra danke ich dafür, dass sie oft noch Zellen hergezaubert hat, als schon alles verloren schien und für ihre Beratung bei histologischen Fragestellungen.

In den ganzen Jahren war mir vor allem Katrin eine starke Stütze. Durch ihre fachliche und methodische Unterstützung hat sie zudem zu dem Erfolg dieses Projekts beigetragen. Simon danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung mit Imaris und dafür, dass ich mich immer an ihn wenden konnte, wenn es nicht weiter ging. Sebastian danke ich für seine freundlich und ruhige Art, die Unterstützung bei Fragen zu Tierversuchsanträgen und die Muster in den Spitzenkästen. Clarissa danke ich dafür, dass sie mir vorgelebt hat, dass es ein Leben nach der Promotion wirklich gibt und Tim dafür, dass er mich immer wieder inspiriert hat. Sandra und Ulrike bin ich dankbar für ihr offenes Ohr und dass sie immer noch ein Lächeln zu verschenken haben.

I thank Robert for his positive thinking and that he taught me how to win a poster prize. Also I appreciate he was checking my English texts and the discussions about research and life in general.

Der gesamten Gruppe danke ich für die familiäre Atmosphäre, die Wochenenddienste im Tierstall und die gemeinsamen Abende. Ich danke euch sehr, dass ihr euch in den guten Zeiten mit mir gefreut habt und mich in den schlechten Zeiten aufgebaut habt.

Zudem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die jahrelange Unterstützung. Sie sind es, die mir Halt gegeben und mir immer wieder Mut gemacht haben, sodass ich alle Aufgaben meistern konnte.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



## Eidesstattliche Erklärung

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Johanna Klein

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Johanna Klein

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Die Rolle endosomaler Toll-like Rezeptoren im Tumormikromilieu*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Johanna Klein* befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sven Brandau  
Wissenschaftl. Betreuers/  
Mitglied der Universität Duisburg-Essen